

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Departamento de Medicina**



**ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS  
CÉLULAS Th17 Y Tfh EN  
ESPONDILOARTRITIS**



**María Belén Bautista Caro**

**Madrid, 2015**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Departamento de Medicina**



**ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS  
Th17 Y Tfh EN ESPONDILOARTRITIS**

**María Belén Bautista Caro**

**Madrid, 2015**



**Departamento de Medicina**  
**Facultad de Medicina**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



# **ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS Th17 Y Tfh EN ESPONDILOARTRITIS**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

**María Belén Bautista Caro**

Licenciada en Biológica, para optar al grado de Doctor

por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores:

**Dra. María Eugenia Miranda Carús**

**Dr. Emilio Martín Mola**

Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz



**MARÍA EUGENIA MIRANDA CARÚS**, Doctora en Medicina,

Médico Adjunto del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

**EMILIO MARTÍN MOLA**, Doctor en Medicina,

Jefe del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

Certifican, que Doña **MARÍA BELÉN BAUTISTA CARO**, licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: “Estudio sobre la biología de las células Th17 y Tfh en Espondiloartritis”, que presenta como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a efectos oportunos, expide y firma la presente en Madrid a 2 de Noviembre de 2015.

Fdo.: Dra. María Eugenia Miranda Carús

Fdo.: Emilio Martín Mola





Esta Tesis ha sido realizada en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz de Madrid, gracias a los proyectos financiados por el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI 13/00084), RAPHYME (red CAM S2010/BMD-2350), el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 2009-07100), Roche Farma y la Fundación Española de Reumatología.



*A mis padres*

*A mis hermanos*

*A Mario*



.....

*“A veces,  
la persona que nadie imagina capaz de nada,  
hace cosas increíbles”*  
-The Imitation Game-

.....



## ***Agradecimientos***

---





Nunca imaginé que un día sería yo la que escribiera estas líneas de agradecimiento, pero después de un duro esfuerzo ese día ha llegado. Cuando me paro a pensar en todas las personas a las que agradecerles su ayuda durante estos años me vienen tantos nombres a la cabeza que espero no dejarme a nadie.

En primer lugar, quería agradecer a la Dra. M<sup>a</sup> Eugenia Miranda Carús la oportunidad que me brindó de poder formar parte de su equipo. Por haberme iniciado en el mundo de la investigación y haberme enseñado tantas cosas sobre Reumatología y en concreto sobre las Espondiloartritis. Gracias por guiarme en cada momento durante todos estos años.

Asimismo, quiero agradecer a mi codirector el Dr. Emilio Martín Mola por facilitar el desarrollo de esta Tesis. Gracias también a todo el servicio de Reumatología del Hospital La Paz, en especial al Dr. Alejandro Balsa y al Dr. Eugenio de Miguel por interesarse siempre por los avances en mis experimentos y estar siempre disponibles para cualquier consulta. A Conchi, Diana, Alex, Chami y Leti Lojo por el reclutamiento de pacientes ya que sin vuestra ayuda este trabajo no habría podido realizarse. A Lola, Cai-Cai, Camino y Adela por estar siempre dispuestas a participar en nuestro estudio como controles sanos. Agradecer especialmente a las enfermeras Carmen, Estrella, Cani, Marta y M<sup>a</sup> Jesús que hayan “pinchado” tanto a pacientes como a controles. Sin olvidarme de la auxiliar del Hospital de Día, Ana que a veces me ayudaba a encontrar nuevos candidatos sanos jeje.

También a las enfermeras del edificio de laboratorios M<sup>a</sup> Jesús y Yolanda (la Supervisora) que nunca pusieron pegas cuando aparecía por allí con un nuevo control sano al que había que sacar sangre.

A todos los pacientes que han participado en estos estudios porque sin ellos esta Tesis nunca hubiera podido realizarse. Ojalá que algún día pueda hacerse realidad lo que muchos de ellos me decían: “todo sea por intentar encontrar alguna cura para esta enfermedad”.

A todos y cada uno de los voluntarios sanos que han participado desinteresadamente y han hecho posible este trabajo. Entre ellos a Susana “la secre”, Carol, Luis Álvarez, Isabel, Toñi, etc... gracias por estar siempre disponibles para donar sangre. A Pedro gracias por ayudarme a convencer a Pablo cuando se hacía de rogar jejeje. Y sobre todo

## *Agradecimientos*

dar las gracias a Pablo, por “sus consejos de sabio” y por darme sangre cada vez que lo he necesitado.

A mis compañeras de laboratorio en diferentes etapas durante estos años: Yolanda, Amada e Irene, gracias por ayudarme cuando lo he necesitado. Y a Irene gracias también por los momentos compartidos durante los congresos y en esta última etapa de la Tesis.

A Arancha, Vir, Lupe, Ana, Raquel, Sara y Águeda, gracias y mil gracias por estar ahí siempre que lo he necesitado. Gracias por los momentos vividos tanto dentro como fuera de esta nuestra unidad, que espero sigan siendo muchos más. Chicas, sois las mejores!!!

A Rocío, Inma y Rosa, que aunque están en otro edificio siempre han tenido palabras de ánimo. A Miguel por todo su apoyo durante estos años y las miles de charlas que hemos tenido sobre ciencia y la vida en general: gracias Miguel.

A M<sup>a</sup> Elvira, Clara y Dani gracias por los desayunos y la hora de la comida compartidos en los que tanto nos hemos reído.

A Virginia Albiñana, gracias por esas quedadas por Argüelles cuando vivías por Madrid. Qué buenos momentos hemos compartido!!!

A mis amigas del pueblo: María, Estela y Marta. Gracias por cada momento compartido desde hace tantos años. Aunque no estemos cerca sé que siempre estaréis ahí para cualquier cosa.

A Margarita López Trascasa y a sus técnicos por ayudarnos a la hora de medir las inmunoglobulinas de todos los sueros.

Al Dr. José Luis Pablos por acogerme en su laboratorio durante seis meses en los que junto a él y su equipo pude aprender tantísimo. Gracias a todos los chic@s “del Doce” que tan buenos momentos me hicieron pasar y en especial a Carmen y Alicia por esas quedadas fuera del labo tan recorfortantes y por todo su apoyo.

A Mario gracias por estar a mi lado cada día. Por conseguir sacarme una sonrisa en los momentos difíciles, por contagiarme esa alegría y positividad que te caracterizan y por lograr tan solo con un abrazo hacerme sentir que a tu lado nada malo podría pasar. Gracias por apoyarme en todo lo que hago y por tu gran paciencia durante la Tesis.

Y por último, a mis padres por su amor incondicional, por todo su esfuerzo y sacrificio para permitir que pudiera venir a Madrid a estudiar. Ya han pasado 15 años pero aún recuerdo como si fuera ayer, el día que tuvimos que despedirnos. A mis hermanos por estar ahí cada día, por ser mis confidentes y unos buenos amigos. A mi tía Angelita, por querernos tanto a todos. Gracias también a mi tío Juan Manuel, sé que te hubiera hecho ilusión estar conmigo este día, pero estoy segura que me estarás viendo desde el cielo y estarás muy orgulloso de mí. Gracias a todos por enseñarme a ser mejor persona cada día, por apoyarme en todo lo que hago y ayudarme a levantarme cada vez que me caigo. Gracias a vosotros soy quien soy y estoy muy orgullosa de la familia que tengo.

A todos, MUCHÍSIMAS GRACIAS.



## ***Resumen/Abstract***

---



Las Espondiloartritis (EspA) son un grupo de enfermedades inflamatorias crónicas de etiología desconocida que comparten características clínicas, radiológicas y genéticas. El prototipo de enfermedad es la Espondilitis Anquilosante (EA) que junto a EspA axial no radiológica (EspA-nr) forman las EspA axiales que se caracterizan por un predominio de la afección de las articulaciones sacroilíacas y/o de la columna vertebral. Existen evidencias genéticas, modelos *in vitro*, estudios de expresión en humanos y modelos animales que apoyan la implicación del eje IL-23/IL-17 en la fisiopatología de las EspA, observando además una alteración de las células Th17 en esta enfermedad. Con estos antecedentes quisimos investigar la posible participación de estas células en pacientes con EA y EspA-nr de reciente comienzo (EspA0-nr) para poder dilucidar lo que sucede en estadios iniciales de la enfermedad. Al hacerlo, observamos que las frecuencias de células Th17, Th1 y Th17/Th1 circulantes junto con la secreción de IL-17A e IFN $\gamma$  se encontraban disminuidas en EspA0-nr independientemente de poseer o no la molécula HLA-B27, sin observar estas alteraciones en EA. Además, sólo en EspA0-nr HLA-B27+ existía una excelente correlación negativa de los parámetros clínicos BASDAI, BASFI, ASDAS-PCR, ASDAS-VSG, ASQOL y evaluación global del paciente con las frecuencias de células Th17, Th1 y Th17/Th1 de sangre periférica. Por el contrario, en EA se observó correlación positiva del índice BASDAI con las frecuencias de células Th17 circulantes.

Asimismo, aunque el papel de los linfocitos B y de la inmunidad humoral no está del todo claro en las EspA, algunos autores han detectado autoanticuerpos en estas enfermedades. Por este motivo, quisimos investigar en pacientes con EA la posible participación de las células Tfh (del inglés *T follicular helper*), cuya función es ayudar a la diferenciación y maduración de los linfocitos B a células plasmáticas. Al hacerlo, encontramos que los pacientes con EA que no habían recibido tratamiento con bloqueantes del TNF (EA/nb), pero no aquellos que sí lo estaban recibiendo (EA/b), mostraban una disminución de la frecuencia de células Tfh y de plasmablastos circulantes, junto con una proporción alterada de las subpoblaciones de cTfh, en presencia de niveles normales o aumentados de inmunoglobulinas. Por último, realizamos un estudio *ex vivo* donde demostramos que las células T CD4+CXCR5+ de los pacientes con EA/nb, que contenían proporciones disminuidas de cTfh y un balance alterado de las subpoblaciones de cTfh, presentaban una capacidad reducida de promover la maduración de las células B vírgenes autólogas.

En resumen, los resultados de esta Tesis han permitido profundizar en la posible implicación de las células Th17 y Tfh en la patogenia de las EspA.





Spondyloarthritis (SpA) is a group of chronic inflammatory diseases of unknown etiology that share clinical, radiological and genetic characteristics. Among these, AS is the prototype of SpA, which together with non-radiographic axial SpA (nrSpA) are classified as axial SpA that are characterized by a predominant involvement of sacroiliac joints and/or spine. Cumulative evidence from genetics studies, in vitro models, human expression studies and animal models strongly supports the involvement of the IL-23/IL-17 axis and a dysregulation of Th17 cells in the pathogenesis of SpA. With this background, we wanted to investigate on the possible involvement of Th17 cells in patients with AS and early nrSpA (e-nrSpA) in order to elucidate which are the underlying mechanisms in early stages of the disease. We found that the frequencies of circulating Th17, Th1 and Th17/Th1 cells along with the secretion of IL-17A and IFN $\gamma$  were reduced in e-nrSpA patients independently of their HLA-B27 status. In contrast, an expression of IL-17A and IFN $\gamma$  in AS patients was comparable to that observed in healthy controls. In addition, there was an excellent negative correlation of the clinical parameters BASDAI, BASFI, ASDAS-CRP, ASDAS-ESR, ASQOL and patient global assessment with the frequencies of circulating Th17, Th1 and Th17/Th1 cells in HLA-B27+ e-nrSpA patients but not in HLA-B27-. In contrast, the BASDAI index was positively correlated with circulating Th17 cells in AS patients.

Although the role of B cells and humoral immunity is unclear in SpA, some authors have detected autoantibodies in this group of diseases. For this reason, we wanted to investigate in patients with AS the biology of follicular helper T cells (Tfh), whose role is to help B cell differentiation and function. We observed that AS patients naïve for TNF blockers (AS/nb), but not those who were receiving treatment with TNF blockers (AS/b), showed a decreased frequency of circulating Tfh cells and plasmablasts, together with an altered proportion of cTfh subpopulations, in the presence of normal or elevated levels of immunoglobulins. Finally, we performed ex vivo studies where we demonstrated that CD4+CXCR5+ T cells from AS/nb patients, containing decreased proportions of cTfh, together with an altered balance of cTfh subpopulations, demonstrated a reduced capacity to promote maturation of naïve autologous B cells.

In summary, the results of this Thesis have contributed to increasing previous evidence on possible involvement of Th17 and Tfh cells in the pathogenesis of SpA.



## ***Índice***

---



Agradecimientos.....	xiii
Resumen/Abstract.....	xix
Índice.....	1
Abreviaturas.....	7
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17</b>
1. ESPONDILOARTRITIS .....	19
2. FISIOPATOLOGÍA DE LAS EspA.....	22
2.1 HLA-B27.....	22
2.2 TNF $\alpha$ .....	26
2.3 ERAP1 .....	27
2.4 Eje IL-23/IL-17 e IL-23R.....	27
3. LINFOCITOS T.....	29
3.1 Th1 .....	29
3.2 Th2 .....	30
3.3 Treg .....	31
3.4 Th17 .....	31
3.5 Th22 .....	35
3.6 Th9 .....	36
3.7 Tfh .....	36
4. TRATAMIENTOS EN EspA .....	41
4.1 Tratamiento no biológico .....	41
4.2 Tratamiento biológico .....	41
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
A. OBJETIVOS DEL ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS Th17 EN PACIENTES CON ESPONDILOARTRITIS AXIAL NO RADIOLÓGICA DE RECIENTE COMIENZO Y ESPONDILITIS ANQUILOSANTE ESTABLECIDA .....	49
B. OBJETIVOS DEL ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS Tfh EN PACIENTES CON ESPONDILITIS ANQUILOSANTE ESTABLECIDA .....	49
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
1. PACIENTES.....	53
1.1 Características de los pacientes con EspA0-nr y EA que donaron sangre periférica para realizar el estudio sobre células Th17 .....	53
1.2 Características de los pacientes con EA que donaron sangre periférica para realizar el estudio sobre células Tfh .....	55
2. CULTIVOS CELULARES.....	57
2.1 Cultivos primarios .....	57
2.1.1 Purificación de linfocitos T CD4+ y T CD4+CXCR5+ .....	57
2.1.2 Purificación de linfocitos B CD19+ vírgenes y de memoria .....	57
2.2 Condiciones de cultivo .....	58

2.2.2 Cocultivos de células T/células B autólogas en el estudio de células Tfh	58
3. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	59
3.1 Tinción de superficie .....	59
3.2 Tinción intracelular .....	60
4. ELISAS ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ) .....	61
5. DETERMINACIÓN DE IgG, IgA e IgM EN SUERO .....	62
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
A. ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS Th17 EN PACIENTES CON ESPONDILOARTRITIS AXIAL NO RADIOLÓGICA DE RECIENTE COMIENZO Y ESPONDILITIS ANQUILOSANTE ESTABLECIDA.....	67
1. EXPRESIÓN DE IL-17 E IL-22 EN CÉLULAS T CD4+ DE PACIENTES CON EspA0-nr Y EA.....	67
2. EXPRESIÓN DE IFN- $\gamma$ EN CÉLULAS T CD4+ DE PACIENTES CON EspA0-nr Y EA.....	70
3. FRECUENCIA DE CÉLULAS Th17/Th1 EN PACIENTES CON EspA0-nr Y EA .....	71
4. EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ , IL-10 E IL-4 EN CÉLULAS T CD4+ DE PACIENTES CON EspA0-nr .....	72
5. FRECUENCIA DE CÉLULAS T CD4+CD25+CD127- Y DE CÉLULAS T CD4+FoxP3+ CIRCULANTES EN PACIENTES CON EspA0-nr Y EA.....	74
6. RELACIÓN ENTRE LAS CÉLULAS Th17, Th1 Y Th17/Th1 CIRCULANTES Y LOS PARÁMETROS CLÍNICOS EN PACIENTES CON EspA0-nr Y EA .....	75
B. ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS Tfh EN PACIENTES CON ESPONDILITIS ANQUILOSANTE ESTABLECIDA .....	78
1. EXPRESIÓN DE LOS HOMÓLOGOS CIRCULANTES DE LAS CÉLULAS Tfh CLÁSICAS EN PACIENTES CON EA.....	78
2. FRECUENCIA DE LAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS cTfh EN PACIENTES CON EA.....	80
3. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE PLASMABLASTOS CIRCULANTES EN PACIENTES CON EA .....	82
4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS T CD4+CXCR5+ CIRCULANTES.....	84
5. NIVELES DE IgG, IgA E IgM EN SUERO DE PACIENTES CON EA Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD Y EL NÚMERO DE cTfh.....	87
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>93</b>
A. ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS Th17 EN PACIENTES CON ESPONDILOARTRITIS AXIAL NO RADIOLÓGICA DE RECIENTE COMIENZO Y ESPONDILITIS ANQUILOSANTE ESTABLECIDA.....	95

B. ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS T <sub>FH</sub> EN PACIENTES CON ESPONDILITIS ANQUILOSANTE ESTABLECIDA.....	100
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>107</b>
A. ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS T <sub>H</sub> 17 EN PACIENTES CON ESPONDILOARTRITIS AXIAL NO RADIOLÓGICA DE RECIENTE COMIENZO Y ESPONDILITIS ANQUILOSANTE ESTABLECIDA.....	109
B. ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS T <sub>FH</sub> EN PACIENTES CON ESPONDILITIS ANQUILOSANTE ESTABLECIDA.....	109
<i>Bibliografía .....</i>	<i>111</i>
<i>Anexo.....</i>	<i>135</i>





## ***Abreviaturas***

---



**-A-**

<b>Ab</b>	Anticuerpo
<b>ADA</b>	Adalimumab
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>AHR</b>	Receptor de Aril Hidrocarburos (del inglés <i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i> )
<b>AINEs</b>	AintiInflamatorios No Esteroideos
<b>APC</b>	Aloficocianina (del inglés <i>Allophycocyanin</i> )
<b>APs</b>	Artritis Psoriásica
<b>AR</b>	Artritis Reumatoide
<b>ARe</b>	Artritis Reactiva
<b>ASAS</b>	Criterios de clasificación para Espondiloartritis (del inglés <i>Assessment of SpondyloArthritis international Society</i> )
<b>ASQOL</b>	Cuestionario específico de la calidad de vida en espondilitis anquilosante (del inglés <i>Ankylosing Spondylitis Quality of Life</i> )
<b>ASDAS-PCR</b>	Puntuación de la actividad de la enfermedad espondilitis anquilosante teniendo en cuenta la PCR (del inglés <i>Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-PCR</i> )
<b>ASDAS-VSG</b>	Puntuación de la actividad de la enfermedad espondilitis anquilosante teniendo en cuenta la VSG (del inglés <i>Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-VSG</i> )

**-B-**

<b>β2-m</b>	beta2-microglobulina
<b>BASDAI</b>	Índice de actividad de la enfermedad espondilitis anquilosante (del inglés <i>Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index</i> )
<b>BASFI</b>	Índice funcional de la enfermedad espondilitis anquilosante (del inglés <i>Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina Sérica Bovina (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i> )

**-C-**

<b>CCR</b>	Receptor de quimioquina tipo C-C (del inglés <i>C-C chemokine Receptor</i> )
<b>CD</b>	Grupo de diferenciación (del inglés <i>Cluster of Differentiation</i> )
<b>CDR</b>	Región determinante de complementariedad (del inglés <i>Complementarity Determining Region</i> )

## Abreviaturas

<b>CGs</b>	Centros Germinales
<b>CIA</b>	Artritis inducida por colágeno (del inglés <i>Colagen Induced Arthritis</i> )
<b>CPA</b>	Célula Presentadora de Antígeno
<b>cTfh</b>	Linfocito T colaborador follicular circulante (del inglés <i>circulating T follicular helper</i> )
<b>CU</b>	Colitis Ulcerosa
<b>CXCL</b>	Quimioquina tipo C-X-C (del inglés <i>C-X-C motif Ligand</i> )
<b>CXCR</b>	Receptor de quimioquina tipo C-X-C (del inglés <i>C-X-C chemokine Receptor</i> )
<b>CZP</b>	Certolizumab

## -E-

<b>EA</b>	Espondilitis Anquilosante
<b>EA/b</b>	Espondilitis Anquilosante en tratamiento con bloqueantes del TNF
<b>EA/nb</b>	Espondilitis Anquilosante sin tratamiento con bloqueantes del TNF
<b>EII</b>	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
<b>ERAP1</b>	Aminopeptidasa del retículo endoplasmático (del inglés <i>Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1</i> )
<b>EspA</b>	Espondiloartritis
<b>EspA0-nr</b>	Espondiloartritis axial no radiológica de reciente comienzo
<b>EspA-EII</b>	Espondiloartritis asociada a Enfermedad Inflamatoria Intestinal
<b>ESSG</b>	Criterios de clasificación para Espondiloartritis (del inglés <i>European Spondyloarthropathy Study Group</i> )
<b>ETN</b>	Etanercept

## -F-

<b>FAME</b>	Fármaco Modificador de la Enfermedad
<b>Fab</b>	Región de unión a antígeno (del inglés <i>Fragment antigen binding</i> )
<b>Fc</b>	Región constante (del inglés <i>Fragment crystallizable</i> )
<b>Frs</b>	Regiones altamente conservadas (del inglés <i>Framework regions</i> )
<b>Fv</b>	Región variable (del inglés <i>Fragement variable</i> )

<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína (del inglés <i>Fluorescein Isothiocyanate</i> )
<b>FoxP3</b>	Factor de transcripción denominado <i>Forkhead box Protein 3</i> )
<b>-G-</b>	
<b>GALT</b>	Tejido linfoide asociado a mucosa intestinal (del inglés <i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i> )
<b>GATA3</b>	Proteína 3 de unión a GATA (del inglés <i>GATA-binding protein 3</i> )
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos (del inglés <i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i> )
<b>GOL</b>	Golimumab
<b>GWAS</b>	Estudios de genoma completo (del inglés <i>Genome-Wide Association Study</i> )
<b>-H-</b>	
<b>HLA-B27</b>	Antígeno Leucocitario Humano-B27 (del inglés <i>Human Leukocyte Antigen-B27</i> )
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante (del inglés <i>Horseradish Peroxidase</i> )
<b>-I-</b>	
<b>ICOS</b>	Proteína inducible coestimuladora de células T (del inglés <i>Inducible T cell COStimulation</i> )
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IFX</b>	Infliximab
<b>Ig / Igs</b>	Inmunoglobulina / Inmunoglobulinas
<b>IL-</b>	Interleuquina- (del inglés <i>InterLeukin-</i> )
<b>IL-...R</b>	Receptor de la Interleuquina ... (del inglés <i>InterLeukin-Receptor</i> )
<b>IRM</b>	Imagen por Resonancia Magnética
<b>-K-</b>	
<b>KIRs</b>	del inglés <i>Killer Immunoglobulin-like Receptors</i>
<b>-L-</b>	
<b>LES</b>	Lupus Eritematoso Sistémico

## Abreviaturas

**LILRs** del inglés *Leucocyte Immunoglobulin-Like Receptors*

**LTC** Linfocito T Citotóxico

**LT $\alpha$ 3** Linfotóxina  $\alpha$ 3

## -M-

**mAb** Anticuerpo monoclonal (del inglés *monoclonal Antibody*)

**MHC-I** Complejo Mayor de Histocompatibilidad-I (del inglés *Major Histocompatibility Complex-I*)

**MHC-II** Complejo Mayor de Histocompatibilidad-II (del inglés *Major Histocompatibility Complex-II*)

## -N-

**NF- $\kappa$ B** Factor nuclear kappa B (del inglés *Nuclear Factor-kappa B*)

**NK** Linfocito citolítico natural (del inglés *Natural Killer*)

## -P-

**PBMCs** Células mononucleares de sangre periférica (del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

**PBS** Tampón fosfato salino (del inglés *Phosphate Buffered Saline*)

**PCR** Proteína C Reactiva

**PD-1** Proteína de muerte celular programada 1 (del inglés *Programmed cell Death-1*)

**PE** Ficoeritrina (del inglés *Phycoerythrin*)

**PerCP** del inglés *Peridinin chlorophyll*

**PerCP-Cy5.5** del inglés *Peridinin chlorophyll cyanine 5.5*

**PFA** Paraformaldehído

**PMA** Acetato de forbol miristato (del inglés *Phorbol Myristate Acetate*)

**PU.1** Factor de transcripción también denominado Spi-1 (del inglés *SSFV proviral integration-1*)

**-R-**

<b>RE</b>	Retículo Endoplasmático
<b>RIQ</b>	Rango intercuartil
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	Factor de transcripción denominado <i>Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor-gamma t</i>
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo celular (del inglés <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> )

**-S-**

<b>SEB</b>	Enterotoxina estafilocócica B (del inglés <i>endotoxin-reduced staphylococcal enterotoxin</i> )
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino (del inglés <i>Serum Fetal Bovine</i> )
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido (del inglés <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i> )
<b>SSZ</b>	Sulfasalazina
<b>STAT</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción (del inglés <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> )

**-T-**

<b>TAP</b>	Transportador asociado con procesamiento de antígenos (del inglés <i>Transporter associated with Antigen Processing</i> )
<b>T-bet</b>	Factor de transcripción también denominado factor de transcripción de unión a caja 21 o Tbx21 (del inglés <i>T-box transcription factor</i> )
<b>TCR</b>	Receptor de Células T (del inglés <i>T Cell Receptor</i> )
<b>Tfh</b>	Linfocito T colaborador folicular (del inglés <i>T follicular helper</i> )
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta (del inglés <i>Transforming Growth Factor beta</i> )
<b>Th</b>	Linfocito T colaborador (del inglés <i>T helper</i> )
<b>TLRs</b>	Receptor tipo Toll (del inglés <i>Toll-Like Receptors</i> )
<b>TMB</b>	Tetrametilbencileno (del inglés <i>Tetramethylbenzidine</i> )

## *Abreviaturas*

**TNF $\alpha$**  Factor de Necrosis Tumoral alpha (del inglés *Tumoral Necrosis Factor alpha*)

**Treg** Linfocito T regulador

**-V-**

**VSG** Velocidad de Sedimentación Globular







# **I. INTRODUCCIÓN**

---



## 1. ESPONDILOARTRITIS

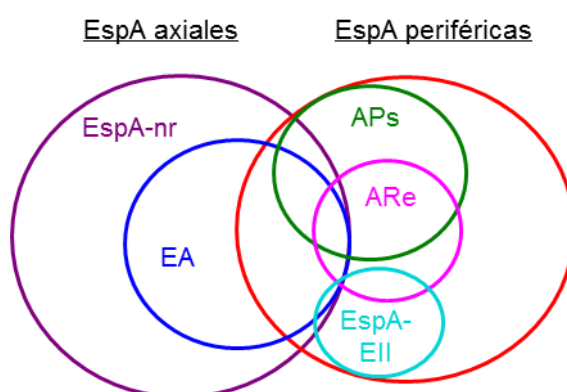
---

Las Espondiloartritis (EspA) son un grupo de enfermedades inflamatorias crónicas de etiología desconocida que tienen asociados factores genéticos y medioambientales. En la década de los años 60 y principios de los 70 fueron reconocidas como una familia de enfermedades que compartían características clínicas, radiológicas y genéticas. El prototipo de enfermedad de este grupo es la Espondilitis Anquilosante (EA) que junto a artritis reactiva, artritis psoriásica, artritis asociada a enfermedad inflamatoria intestinal y un subgrupo de artritis idiopática juvenil componen la familia de las EspA (Dougados and Baeten, 2011; Moll et al., 1974; Sheehan, 2004; Wright, 1978).

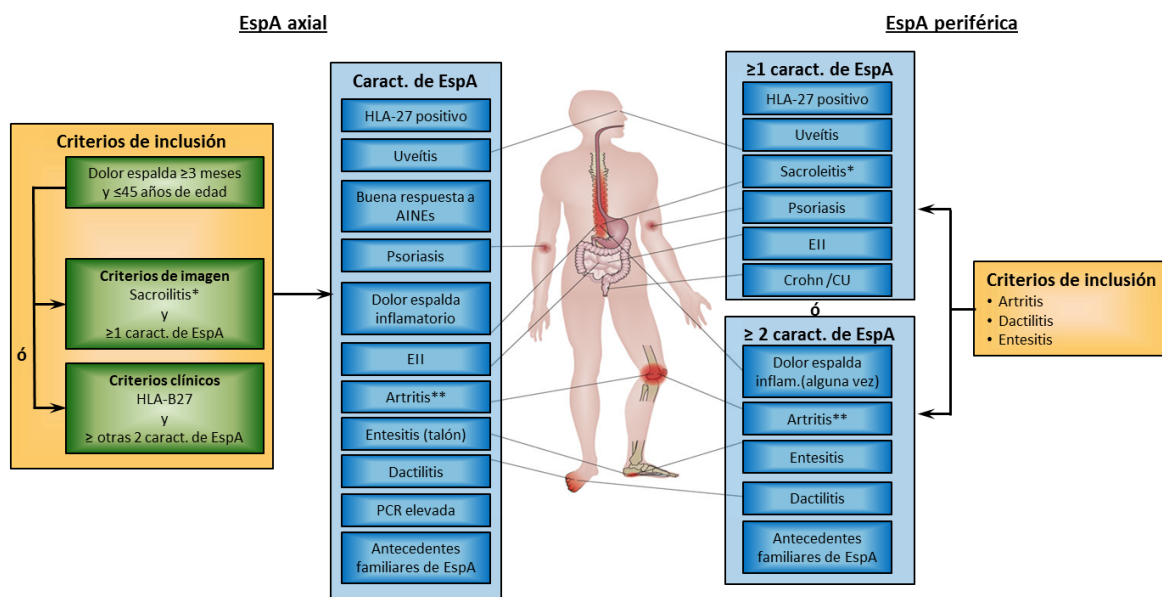
Los rasgos clínicos y genéticos que caracterizan a las EspA son la presencia de dolor e inflamación del esqueleto axial (articulaciones sacroilíacas y columna vertebral), artritis periférica, entesitis (proceso inflamatorio de la entesis que es la zona de inserción de los tendones y ligamentos al hueso), dactilitis (inflamación de dedos de las manos o pies), manifestaciones extra-articulares que incluyen uveítis anterior recidivante (inflamación de la parte anterior del ojo o iris), psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal (EII), además de la presencia de la molécula HLA-B27 (del inglés *Human Leukocyte Antigen-B27*) (Brebán, 2006; Khan, 2002; Khan et al., 2007; Poddubnyy and Rudwaleit, 2012). La inflamación puede ir acompañada por diferentes grados y tipos de daño estructural que van desde destrucción a nueva formación ósea e incluso, anquilosis completa de articulaciones axiales y periféricas (Paramarta and Baeten, 2014).

A lo largo de los años, se han propuesto diferentes criterios de clasificación para las EspA. En la década de los años 80 se propusieron los criterios de Nueva York (van der Linden et al., 1984) que iban dirigidos a identificar pacientes con EA. Estos criterios presentaban algunas restricciones ya que se centraban en las manifestaciones axiales de la enfermedad omitiendo el resto de características clínicas. En 1990, Amor y col. (Amor et al., 1990) propusieron los primeros criterios de clasificación para el grupo completo de EspA. Un año después el grupo ESSG (del inglés *European Spondyloarthropathy Study Group*) desarrolló criterios en los que se incluían dolor de espalda inflamatorio y artritis periférica como principales rasgos de clasificación (Dougados et al., 1991), pero ambos criterios presentaban limitaciones para detectar etapas iniciales de la enfermedad en las que aún no se observaba sacroileítis radiológica definitiva. Por este motivo, en 2009 el grupo ASAS (del inglés *Assessment of SpondyloArthritis international Society*) (Rudwaleit et al.,

2009a, 2009b) desarrolló nuevos criterios de clasificación en los que se incluían datos de imagen por resonancia magnética (IRM) para poder identificar pacientes con afección predominantemente axial que aún no presentaban cambios radiológicos en la radiología convencional, pero sí en la IRM. A estos pacientes se les denominó EspA axial no radiológicas (EspA-nr) (**Figura 1 y 2**). De este modo se podría realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad e intentar retrasar la progresión radiológica con un tratamiento temprano, ayudando así a mejorar la calidad de vida de los pacientes. Las EspA-nr, junto a aquellos pacientes que presentaban cambios radiológicos (pacientes con EA) constituían el grupo denominado **EspA axiales**, caracterizados por una afectación predominantemente de las articulaciones sacroilíacas y/o de la columna vertebral. Por otro lado, el grupo ASAS también estableció criterios de clasificación para las EspA que presentaban con mayor frecuencia un predominio periférico (artritis periférica, entesitis y/o dactilitis), denominándolas **EspA periféricas** en las que se incluían entidades como artritis psoriásica, artritis reactiva y artritis asociada a EII (**Figura 1 y 2**).

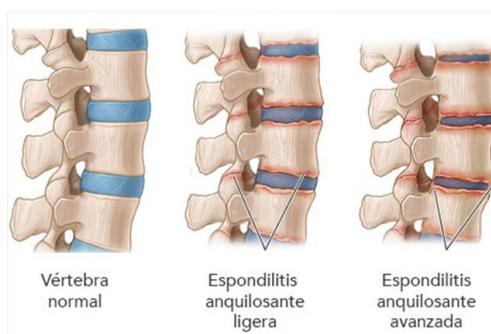


**Figura 1. Representación gráfica del espectro de las EspA mediante diagramas de Venn.** Entre las EspA con predominio axial se encuentran la EA y EspA-nr. Esta última incluye casos con una clínica precoz y sin manifestaciones radiológicas. Entre las EspA con predominio periférico se encuentran la APs, ARe y EspA-EII. Existen áreas de solapamiento entre los diferentes tipos de EspA poniendo de manifiesto que presentan características clínicas comunes. EA: Espondilitis Anquilosante, EspA-nr: Espondiloartritis axial no radiológica, APs: Artritis Psoriásica, ARe: Artritis Reactiva, EspA-EII: Espondiloartritis asociada a Enfermedad Inflamatoria Intestinal. (Adaptado de Raychaudhuri S.P. y col., 2013).



**Figura 2. Criterios de clasificación ASAS para EspA axiales y EspA periféricas.** Los criterios ASAS distinguen EspA axial de periférica mediante la presencia de diferentes combinaciones de criterios de inclusión clínicos y de imagen y del número de características de EspA. \*Sacroileítis por imagen (rayos X o IRM) que puede ser sacroileítis radiológica definida según los criterios de Nueva York (grado 2 bilateral o grado 3-4 unilateral) o inflamación activa de las articulaciones sacroilíacas por IRM altamente sugestiva de sacroileítis asociada con EspA. \*\*Artritis: siempre predominantemente de los miembros inferiores y/o artritis asimétrica. EspA: Espondiloartritis, EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal, CU: Colitis Ulcerosa. (Adaptado de van Tubergen A., 2014).

Dado que para el desarrollo de esta Tesis nos centraremos en el estudio de las EspA axiales, a continuación explicaremos con más detalle las características de este subgrupo de EspA formado por EA y EspA-nr. La **EA** es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta fundamentalmente a las articulaciones sacroilíacas y de la columna vertebral, que tienden a soldarse entre sí provocando una limitación en la movilidad de los pacientes (**Figura 3**). Este daño estructural se denomina anquilosis ósea y se caracteriza por una formación de hueso excesiva que conduce a la formación de espolones óseos, como sindesmofitos, que contribuyen a la anquilosis de las articulaciones y a la mala función física (Schett and David, 2010).



**Figura 3. Proceso de anquilosis de las vértebras en EA.** En las primeras etapas de la EA se observa inflamación acompañada de erosión ósea (**columna vertebral central**). Cuando la enfermedad está más

avanzada se observa proliferación ósea llegando incluso hasta la fusión completa de las vértebras (**columna vertebral derecha**). (Adaptado de <http://www.biocentro.cl/espondilitis-anquilosante/>).

Se ha descrito que los hombres suelen verse más afectados que las mujeres (2 ó 3 hombres por cada mujer afectada) y que la prevalencia de la EA es de 0,5% mientras que la del grupo de EspA es de 1,5-2%, ambas en población caucásica (Braun et al., 1998; Helmick et al., 2008). Por lo general, el primer síntoma de las EspA axiales suele ser dolor de espalda y comienza en torno a los 20-30 años de edad, pero debido a la aparición tardía de sacroileítis radiológica en muchos casos el diagnóstico de EA se retrasa al menos 6-8 años desde el comienzo de los primeros síntomas (Rudwaleit et al., 2011). Por este motivo es importante un diagnóstico precoz que facilite la consecución de una buena respuesta a los tratamientos para evitar una discapacidad crónica. Dicho diagnóstico se puede conseguir gracias a los nuevos criterios de clasificación descritos por el grupo ASAS (**Figura 2**), que permiten identificar pacientes con EspA que aún no presentan cambios radiológicos, denominados **EspA-nr** (**Figura 1**).

## 2. FISIOPATOLOGÍA DE LAS EspA

---

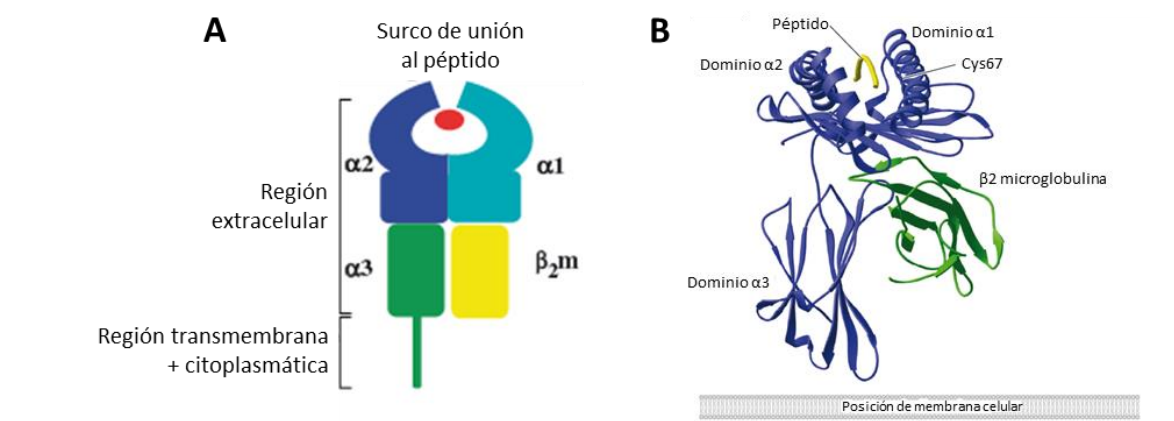
### 2.1 HLA-B27

Se ha descrito que la molécula HLA-B27 se asocia fuertemente con las EspA, ya que está presente en el 90% de los pacientes con EA y casi el 70% de las EspA axiales (Rudwaleit et al., 2009c), mientras que sólo 6-10% de la población caucásica general lo posee (Rudwaleit et al., 2004). Sin embargo, la presencia de HLA-B27 no es causal, ya que sólo entre el uno y el cinco por ciento de las personas HLA-B27+ desarrollarán EA (Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC) et al., 2010).

El alelo HLA-B27 es una molécula MHC de clase I (MHC-I, del inglés *Major Histocompatibility Complex-I*). Las moléculas MHC-I se localizan en el cromosoma 6 y su principal función es la presentación de antígenos a los linfocitos T CD8+ citotóxicos (LTC) como parte de la respuesta inmune adaptativa. Por otra parte, las moléculas MHC-I también juegan un papel crítico en la regulación de la respuesta inmune innata a través de su capacidad de interactuar con receptores de las células *Natural Killer* (NK). En condiciones fisiológicas, esta molécula forma complejos trimoleculares entre la cadena pesada (compuesta por 3 dominios  $\alpha$ ), la  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m) y los péptidos intracelulares derivados de proteínas propias, virus y bacterias (**Figura 4**). Estos complejos



trimoleculares emergen a la superficie de la célula presentadora de antígeno (CPA) para presentar el antígeno a los LTC que lo reconocerán a través del TCR (del inglés *T Cell Receptor*) (Allen et al., 1999).



**Figura 4. Estructura de la molécula HLA-B27.** Los tres dominios  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ) forman la cadena pesada de la molécula MHC-I que se unirá no covalentemente con  $\beta_2m$  y con el péptido para formar un complejo trimolecular. (A) Esquema general de la estructura extracelular e intracelular de una molécula MHC-I. (B) Estructura de lazo de la molécula HLA-B27 con el péptido.  $\beta_2m$ :  $\beta_2$ -microglobulina. (Adaptado de McHugh K. y col., 2012 y Bowness P., 2015).

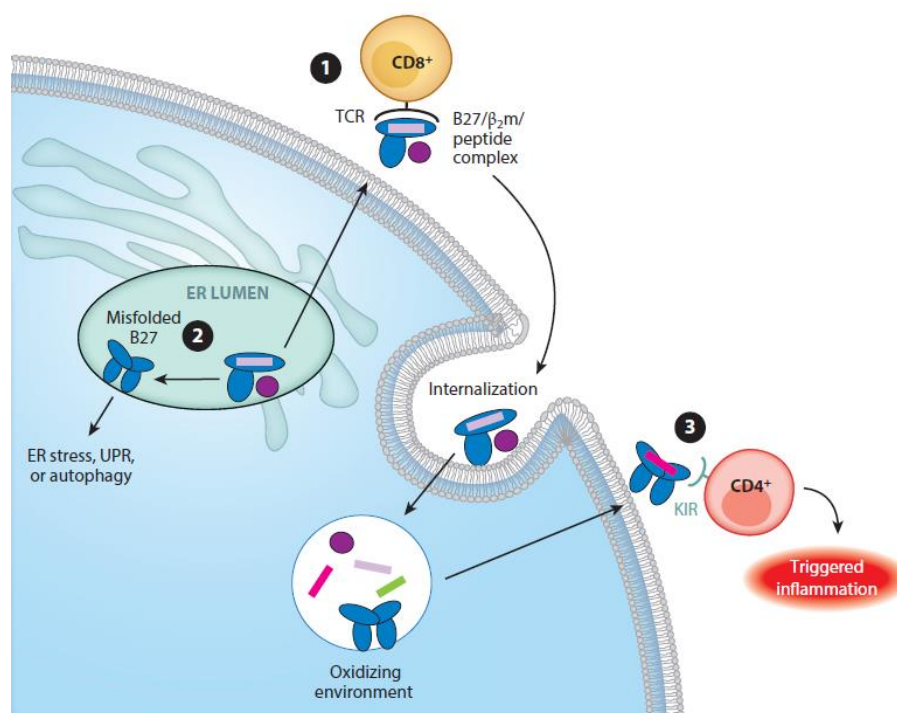
El mecanismo por el cual la molécula HLA-B27 estaría implicada en la patogenia de las EspA es desconocido, pero existen tres teorías que intentan explicar su implicación en estas enfermedades. En primer lugar se encuentra la hipótesis tradicional, también llamada “**teoría péptido-artritogénica**” basada en la presentación antigénica al LTC. Según esta teoría, la molécula HLA-B27 presentaría en superficie un péptido derivado de un patógeno con secuencias homólogas a proteínas propias humanas, de modo que la unión del péptido a la molécula HLA-B27 daría lugar a una reacción inmune por reactividad cruzada provocando que algunos LTC activados superasen la tolerancia contra ese péptido, induciéndose autoinmunidad, daño tisular e inflamación (Benjamin and Parham, 1990) (**Figura 5.1**). Alternativamente, otros autores han descrito que la propia molécula HLA-B27 presenta secuencias de aminoácidos homólogas a determinados microorganismos, siendo reconocidas por LTC autoreactivos (Ramos et al., 2002). Finalmente, también se ha descrito que la molécula HLA-B27 podría presentar en superficie un péptido propio caracterizado por una homología estructural con un péptido derivado de un agente patógeno (por ejemplo *Klebsiella*, *Yersinia* o *Chlamydia*) (Atagunduz et al., 2005). Sin embargo, varios autores demostraron en ratas transgénicas HLA-B27 que las células T CD8<sup>+</sup> no eran esenciales en la patogenia de la enfermedad (May et al., 2003; Taurog et al., 2009) e incluso otros autores encontraron que ratones transgénicos HLA-B27 desarrollaban

artritis espontánea en ausencia de  $\beta 2m$ , sugiriendo un papel patogénico de las cadenas pesadas de esta molécula libres de  $\beta 2m$  (Khare et al., 1995, 1996). En este sentido, a diferencia de otras moléculas MHC-I, el HLA-B27 posee un residuo de cisteína desapareada en la posición 67 (Cys67) situado en el surco de unión al péptido (**Figura 4B**) y se ha detectado la formación de homodímeros de cadenas pesadas libres de  $\beta 2m$  de manera dependiente de Cys67 (Allen et al., 1999). Por otro lado, se ha observado la capacidad del HLA-B27 de unirse a péptidos de mayor longitud que los que se unen a otras moléculas MHC-I (Urban et al., 1994), dando como resultado una conformación plegada de la molécula más laxa y propensa al mal plegamiento y/o a la formación de homodímeros. Asimismo, se ha encontrado que el plegamiento de las cadenas pesadas del HLA-B27 parece ser más lento que en el caso de otras moléculas MHC-I (Antoniou et al., 2004). Como consecuencia, el HLA-B27 tendría tendencia a plegarse mal durante su síntesis en el retículo endoplásmico (RE), incluso en presencia de niveles normales de péptido y  $\beta 2m$ . Por último, se ha visto que en comparación a otras moléculas de MHC-I, el HLA-B27 es menos dependiente de tapasina, una chaperona del RE que mantiene unida la molécula HLA-B27 a las proteínas TAP (del inglés *Transporter associated with Antigen Processing*), facilitando la unión del péptido al HLA-B27 (Peh et al., 1998). Esta menor dependencia de tapasina daría lugar a la síntesis en el RE de complejos HLA-B27 unidos débilmente a péptidos que podrían disociarse en la superficie celular (Benjamin et al., 1991). Sin el péptido, la  $\beta 2m$  también podría disociarse provocando un acúmulo de cadenas pesadas en la superficie celular que podrían formar homodímeros.

Con estos antecedentes, surgieron dos hipótesis alternativas, que no estaban relacionadas con la presentación antigénica convencional, para intentar explicar la implicación de la molécula HLA-B27 en estas enfermedades. La primera hipótesis llamada “**teoría del plegamiento anómalo de B27**” sugería que en el RE de la CPA se acumularían moléculas de HLA-B27 mal plegadas. Esta acumulación desencadenaría estrés en el RE provocando autofagia, que contribuiría a la eliminación de proteínas aberrantes para intentar mantener la homeostasis en el RE (Kroemer et al., 2010). También se desencadenaría la activación de un mecanismo de señalización denominado UPR (del inglés *Unfolded Protein Response*) (Schröder and Kaufman, 2005) que tendría como objetivo aliviar dicho estrés y reestablecer el estado fisiológico normal del RE. Este mecanismo UPR induciría la activación de NF- $\kappa$ B (del inglés *Nuclear Factor-kappa B*) (Pahl and Baeuerle, 1997) provocando el aumento de la producción de citoquinas pro-

inflamatorias como  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 o IL-6 por parte de monocitos/macrófagos, además de la producción de IL-23 por células dendríticas y macrófagos que activaría a las células T productoras de IL-17 (DeLay et al., 2009; Layh-Schmitt and Colbert, 2008) (**Figura 5.2**).

La segunda hipótesis llamada “**teoría de homodímeros de B27**” proponía que debido a una infección bacteriana, hipoxia o señales de estrés se desencadenaría la formación de homodímeros B27 gracias al ensamblaje de las cadenas pesadas de la molécula de HLA-B27 libres de  $\beta 2m$ . Estos homodímeros se expresarían en la superficie celular y podrían ser reconocidos directamente por receptores inmunoreguladores tipo KIRs (del inglés *Killer Immunoglobulin-like Receptors*) y LILRs (del inglés *Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors*) que se expresan en células NK y células T. Además, los LILRs se pueden expresar en monocitos, macrófagos y células dendríticas. Ambos tipos de receptores, una vez que se activan, darían como resultado una respuesta pro-inflamatoria aberrante (Brown et al., 2004; Colonna et al., 1999; Lanier, 1998) (**Figura 5.3**).



**Figura 5. Teorías de la implicación de la molécula HLA-B27 en la patogenia de las EspA. 1) Teoría péptido artritogénico:** péptidos propios o derivados de patógenos son seleccionados y presentados por moléculas HLA-B27 plegadas correctamente para el reconocimiento por el TCR (del inglés *T Cell Receptor*) en células T CD8<sup>+</sup>. **2) Teoría del plegamiento anómalo de B27:** el mal plegamiento de la molécula HLA-B27 en el retículo endoplasmático (RE) puede provocar estrés en el RE, autofagia y un mecanismo de señalización denominado respuesta de proteína mal plegada o UPR (del inglés *Unfolding-Protein Response*) que tendría efectos en la función celular (por ejemplo desencadenar la liberación de IL-23 que podría activar a células T productoras de IL-17) y podrían promover el desarrollo de las EspA. **3) Teoría de homodímeros de B27:** se forman homodímeros de B27 por el ensamblaje de cadenas pesadas libres de  $\beta 2m$ , y éstos se van a expresar en la superficie celular donde son reconocidos por células portadoras de receptores tipo KIRs (del inglés *Killer Immunoglobulin-like Receptors*) y/o receptores tipo LILRs (del inglés *Leukocyte*

*Immunoglobulin-Like Receptors*) pudiendo desencadenar una respuesta pro-inflamatoria aberrante. (Bowness P., 2015).

## 2.2 TNF $\alpha$

El TNF $\alpha$  (del inglés *Tumour Necrosis Factor alpha*) es de gran interés en la perpetuación y mantenimiento de la inflamación en las EspA (Armuzzi et al., 2014). Se ha descrito que es una citoquina pleiotrópica producida principalmente por monocitos y macrófagos, pero también por otros tipos celulares como linfocitos T y NK (Mewar and Wilson, 2011; Tracey et al., 2008), que va a regular reacciones inflamatorias y funciones inmunes a través del control de varios procesos celulares como proliferación, diferenciación, apoptosis y la liberación de otros mediadores de inflamación como IL-1 e IL-6 (Tracey et al., 2008). Además, desempeña un papel importante en la regulación de la homeostasis ósea mediante la estimulación de la osteoclastogénesis y la inhibición de la función de los osteoblastos (Osta et al., 2014).

La mayor evidencia sobre el papel clave del TNF $\alpha$  en la fisiopatología de las EspA viene determinada por los resultados de la inhibición *in vivo* del TNF $\alpha$  en pacientes con estas enfermedades. El bloqueo del TNF $\alpha$  con anticuerpos o receptores solubles recombinantes es altamente efectivo en la reducción de signos y síntomas de inflamación en pacientes con EspA axial y periférica (Braun et al., 2002; Paramarta et al., 2013a; Sieper et al., 2013; Van Den Bosch et al., 2002). A nivel de tejido, el bloqueo del TNF $\alpha$  tiene como resultado una variedad de cambios histológicos que incluyen la disminución de la capa íntima de revestimiento sinovial y de la vascularización, además de la reducción del infiltrado inflamatorio de neutrófilos y macrófagos (Baeten et al., 2001a). Por otro lado, ensayos clínicos demuestran que el bloqueo del TNF $\alpha$  detiene la destrucción de las articulaciones en EspA (van der Heijde et al., 2007), pero falla a la hora de detener la formación ósea (Finzel et al., 2013; van der Heijde et al., 2008a, 2008b, 2009). Por este motivo, se cree que existen otros factores implicados en la patogenia de la enfermedad que podrían ser potenciales dianas terapéuticas. De este modo, gracias a estudios de genoma completo o GWASs (del inglés *Genome-Wide Association Study*) en EA, se ha demostrado y confirmado una fuerte asociación con ERAP1 (del inglés *Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1*) y con IL-23R (del inglés *InterLeukin-23 Receptor*), poniendo de manifiesto que estas moléculas podrían utilizarse como nuevas dianas terapéuticas de la

enfermedad (Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC) et al., 2010; Wellcome Trust Case Control Consortium et al., 2007).

## 2.3 ERAP1

ERAP1 es una enzima aminopeptidasa cuya función es cortar péptidos en el RE hasta conseguir una longitud adecuada para la unión a las moléculas MHC-I, como por ejemplo el HLA-B27 (Kanaseki et al., 2006). En el estudio WTCCC2-TASC (del inglés *Wellcome Trust Case Consortium and The Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium*) se demostró una asociación de los polimorfismos de ERAP1 con EA pero limitada sólo a la presencia de B27+, sugiriendo que el papel patogénico de ERAP1 en EA dependía de su interacción funcional con la molécula HLA-B27 (Evans et al., 2011). Para poder explicar la asociación de ERAP1 con esta enfermedad se han propuesto varias explicaciones mecanísticas. Por un lado, los polimorfismos de ERAP1 podrían alterar el repertorio de péptidos que se unen al HLA-B27 y modular por lo tanto el reconocimiento inmune por LTC (Seregin et al., 2013). Alternativamente, estos polimorfismos de ERAP1 también podrían asociarse a un aumento del estrés en el RE que conduciría tanto al mal plegamiento de la molécula de HLA-B27 como a la formación y exportación a la superficie celular de homodímeros de cadenas pesadas (Haroon et al., 2012), provocando una respuesta inflamatoria aberrante.

## 2.4 Eje IL-23/IL-17 e IL-23R

El IL-23R se expresa principalmente en células T de memoria y células NK. Se sabe que la vía de señalización IL-23/IL-23R es esencial para la diferenciación y mantenimiento de la subpoblación de células T CD4 Th17 (del inglés *T helper 17*) (Layh-Schmitt and Colbert, 2008). En relación con esto existen evidencias genéticas, modelos *in vitro*, estudios de expresión en humanos y modelos animales que apoyarían la implicación del eje IL-23/IL-17 en la patogenia de las EspA, confirmando que dicho eje podría ser una buena diana terapéutica para los pacientes con estas enfermedades:

- Las EspA muestran una fuerte asociación genética con una serie de polimorfismos del gen de *IL23R*, incluyendo el alelo protector rs11209026 (Arg381Gln). Esta variante del gen *IL23R* otorgaría protección frente a EII (Duerr et al., 2006), psoriasis (Cargill et al., 2007) y EA (Wellcome Trust Case

Control Consortium et al., 2007) puesto que media una disminución selectiva de la producción de IL-17A (Di Meglio et al., 2011) debido a una menor fosforilación de STAT-3 (del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription-3*) (molécula implicada en la diferenciación de células Th17) (Sarin et al., 2011). También se han identificado otros genes de riesgo relacionados con la señalización de la IL-17 como por ejemplo: *IL12B*, *STAT3*, *JAK2*, *TYK2*, *CARD9* y *PTGER4*, lo cual apoyaría la implicación del eje IL-23/IL-17 en la patogenia de las EspA (Danoy et al., 2010; Evans et al., 2011; O'Shea et al., 2013; Pointon et al., 2010; Zhang et al., 2015).

- Como ya se ha mencionado en el apartado 2.1 sobre la molécula HLA-B27, experimentos *in vitro* e *in vivo* indican que el mal plegamiento de esta molécula podría dar lugar a un incremento de la producción de IL-23 (DeLay et al., 2009). Por otro lado, la expresión de homodímeros aberrantes de HLA-B27 en la superficie celular también podría desencadenar directamente la producción de IL-17 por células T CD4<sup>+</sup> KIR3DL2<sup>+</sup> (Bowness et al., 2011).
- El hallazgo de la sobreexpresión de IL-23 en biopsias intestinales de pacientes con EA (Ciccia et al., 2009), o el aumento de los niveles de IL-17 y de células Th17 circulantes en pacientes con EA y EspA (Jandus et al., 2008; Shen et al., 2009a, 2009b; Singh et al., 2007; Wang et al., 2009b; Wendling et al., 2007) apoyarían la hipótesis de que las células Th17 podrían representar un papel importante en la patogenia de estas enfermedades.
- Por último, se ha observado en modelos murinos que tanto EspA en ratas transgénicas HLA-B27 (Utriainen et al., 2012) como entesitis anquilosante en ratones F1 (BXSB x NZB) (Abe et al., 2009) se asociaban con un incremento de células Th17 y un aumento en la producción de IL-17. Además, la sobreexpresión de IL-23 en ratones B10.RIII inducía un tipo de enfermedad semejante a EspA a través de una población no identificada previamente de células IL-23R<sup>+</sup> que expresaban ROR $\gamma$ t (del inglés *Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor-gamma t*) y producían IL-17 e IL-22 (Sherlock et al., 2012).

### 3. LINFOCITOS T

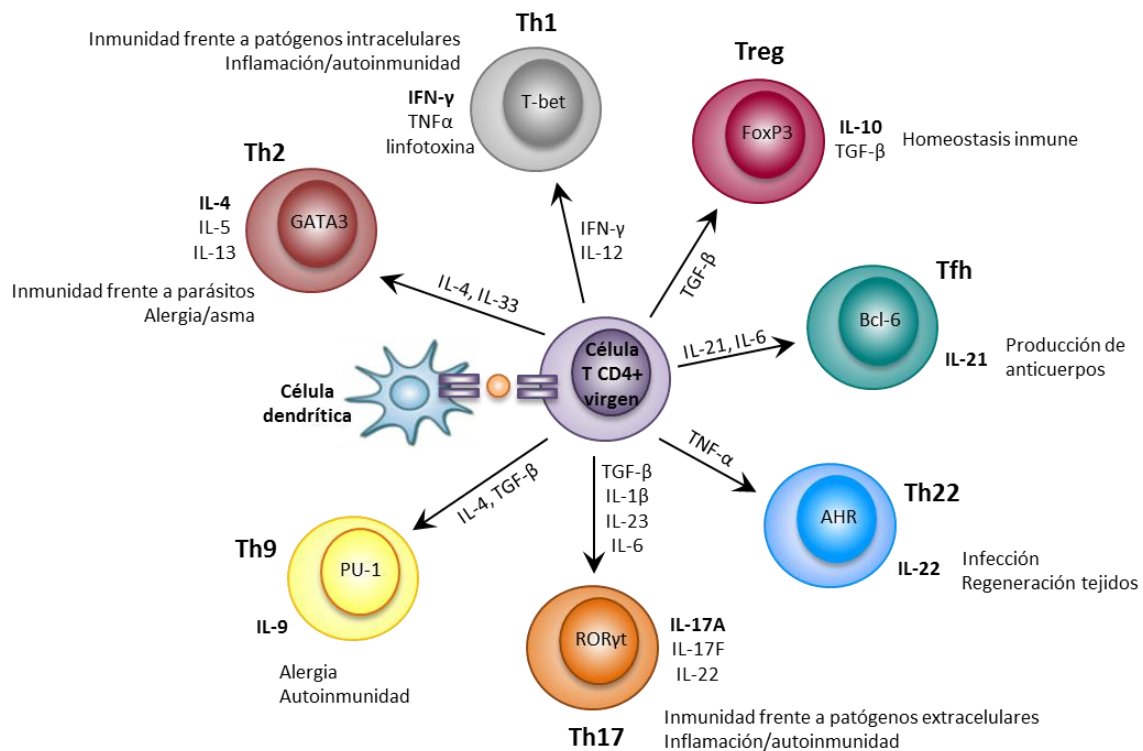
---

El sistema inmune, compuesto por inmunidad innata y adaptativa, interviene en la protección del organismo mediante el reconocimiento y posterior eliminación de antígenos extraños (Noack and Miossec, 2014). Por un lado, las células del sistema inmune innato (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK, etc...) van a actuar como primera línea de defensa contra patógenos extraños. Por otro lado, se encuentran las células del sistema inmune adaptativo formado entre otros, por linfocitos T CD4+ que van a desempeñar un papel importante en la respuesta inmune proporcionando ayuda a otras células mediante la secreción de citoquinas y/o el contacto directo entre células (Noack and Miossec, 2014). Estas células T CD4+ expresan en su superficie TCR que reconoce antígenos unidos a moléculas MHC-II (del inglés *Major Histocompatibility Complex-II*) en la superficie de células dendríticas u otras CPA. La activación del TCR, junto con señales coestimuladoras, va a activar a la célula T CD4+ permitiendo su proliferación, diferenciación y posterior secreción de citoquinas. Dependiendo de la producción de citoquinas y su función efectora específica, estos linfocitos se dividen en diferentes subpoblaciones de células T CD4+: Th1 (del inglés *T helper 1* ó T colaboradores 1), Th2, T reguladoras (Treg), Th17, Th22, Th9 y Tfh (del inglés *T follicular helper*) (Breitfeld et al., 2000; Harrington et al., 2005; Mosmann et al., 1986; Park et al., 2005; Sakaguchi et al., 1995; Schaerli et al., 2000; Trifari et al., 2009).

#### 3.1 Th1

Las células Th1 son responsables de la activación de fagocitos y juegan un papel importante en la protección frente a patógenos intracelulares. Se caracterizan por expresar el factor de transcripción T-bet (del inglés *T-box transcription factor*) y por la producción de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y linfotoxina (Mosmann et al., 1986; Szabo et al., 2000) (Figura 6). La principal citoquina producida por estas células es el IFN $\gamma$  y se ha asociado con enfermedades como diabetes autoinmune tipo 1, esclerosis múltiple y artritis reumatoide (AR) (Raphael and Forsthuber, 2012; Skurkovich and Skurkovich, 2005). El IFN $\gamma$  es una citoquina pro-inflamatoria que incrementa la expresión de TLRs (del inglés *Toll-Like Receptor*) por células de la inmunidad innata (Bosisio et al., 2002), aumenta la presentación de antígeno a través de MHC tipo I y II (Boehm et al., 1997), e induce la

secreción de quimioquinas, la activación de macrófagos y el aumento de fagocitosis (Schroder et al., 2004).



**Figura 6. Diferenciación de células T CD4+ vírgenes en humanos.** Bajo determinadas condiciones de estimulación, las células T CD4+ vírgenes se diferencian a diferentes subpoblaciones: Th1, Th2, Th17, Th22, Th9, Treg y Tfh. (Adaptado de Jiang S. y col., 2013).

### 3.2 Th2

Las células Th2 se caracterizan por su papel en la defensa contra parásitos y su implicación en alergias y enfermedades atópicas. El factor de transcripción característico de este tipo celular es GATA3 (del inglés *GATA-binding protein 3*) y se van a caracterizar por la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 (Mosmann et al., 1986; Zheng and Flavell, 1997) (**Figura 6**). De todas ellas, la principal citoquina producida por este tipo celular es la IL-4, una citoquina multifuncional y pleiotrópica que va a promover la diferenciación de las células Th2, pero a su vez va a inhibir la de otros tipos celulares como las células Th1 ejerciendo así propiedades anti-inflamatorias (Zhu and Paul, 2010). Además, esta citoquina va a promover la maduración y diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas, induciendo el cambio de clase de las inmunoglobulinas (Morita et al., 2011).



### 3.3 Treg

A mediados de los años 90 se identificó una nueva subpoblación de células T *helper* con funciones reguladoras denominadas T reguladoras o Treg (Sakaguchi et al., 1995). Estas células tienen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune caracterizándose por expresar el factor de transcripción FoxP3 (del inglés *Forkhead box P3*), necesario para su desarrollo y sus funciones reguladoras. Además, secretan IL-10 y TGFβ (del inglés *Transforming Growth Factor beta*) (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003) (**Figura 6**).

Numerosos estudios han identificado a las células Treg como inmunorreguladores importantes en muchas patologías inflamatorias y autoinmunes como el asma (Robinson, 2009), esclerosis múltiple (Costantino et al., 2008), diabetes tipo I (Jaekel et al., 2008) y AR (van Amelsfort et al., 2007; Benito-Miguel et al., 2009; Möttönen et al., 2005). Y se han identificado varios mecanismos por los que estas células van a suprimir la respuesta inmune: modulación de la maduración y función de las CPA, muerte de las células diana, alteración de vías metabólicas y producción de citoquinas anti-inflamatorias (Vignali et al., 2008).

### 3.4 Th17

El descubrimiento de las células Th17 como una subpoblación de células T CD4+ diferentes a las células Th1 y Th2 cambió el paradigma dicotómico Th1/Th2, sugiriendo la posibilidad de la existencia de otros subtipos de células T *helper* (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). Hasta su descubrimiento, muchas enfermedades inflamatorias crónicas habían sido consideradas como enfermedades caracterizadas por una respuesta tipo Th1, pero a partir de entonces las células Th17 cobraron importancia considerándose las verdaderas células patogénicas (Chen and O'Shea, 2008).

En 1993 se describió y clonó por primera vez el gen que codifica la IL-17 murina, denominada entonces CTLA-8 (del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated-8*) (Rouvier et al., 1993), que posteriormente fue renombrada como IL-17 (Yao et al., 1995a) e identificada también en humanos (Yao et al., 1995b). Esta citoquina es una glicoproteína de 155 aminoácidos con un 63% de homología al CTLA-8 murino (Yao et al., 1995b) y es el miembro prototipo de la familia de citoquinas IL-17, compuesta por seis miembros: IL-17A (también conocida como IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) e IL-17F, y

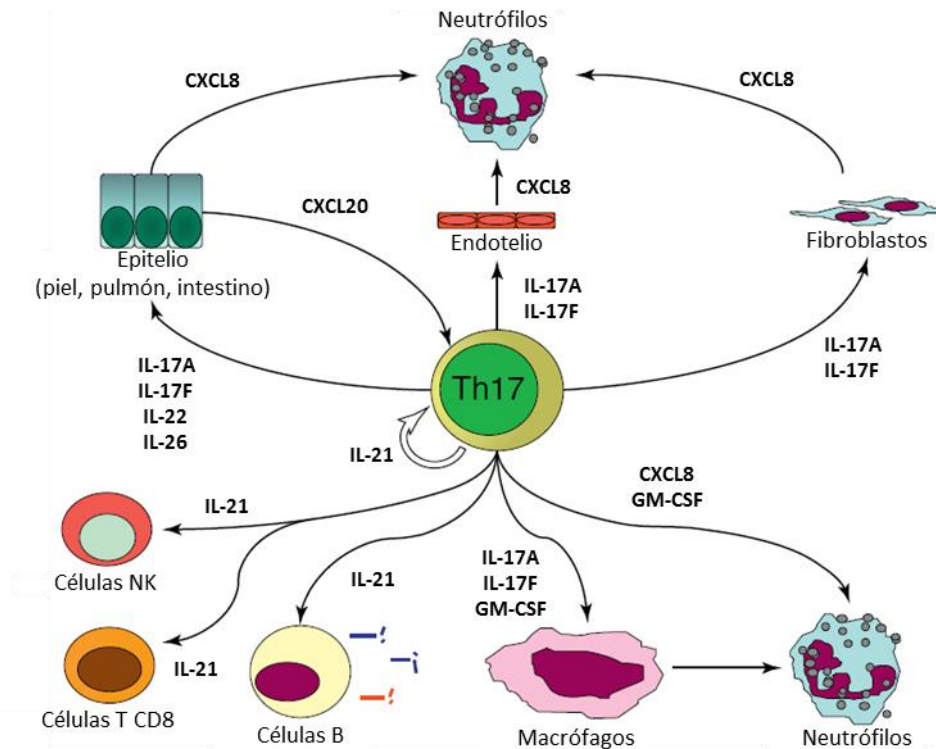
cinco receptores: IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE (Gaffen, 2009). De todos los miembros, la IL-17F es la que presenta mayor homología con respecto a la IL-17A (aproximadamente un 50%) (Hymowitz et al., 2001) y ambas van a señalizar a través del mismo receptor formado por una subunidad IL-17RA y una subunidad IL-17RC, presentando así funciones similares (Gaffen, 2009). El resto de miembros de esta familia poseen menor grado de homología con la citoquina IL-17A. Por último, aunque la IL-17E parece estar implicada en promover la producción de citoquinas Th2, el resto de miembros de esta familia están menos caracterizados (Gaffen, 2009).

Las células Th17 constituyen un linaje de células T *helper* capaz de proteger contra bacterias extracelulares, infecciones por hongos y van a estar implicadas en autoinmunidad y en enfermedades inflamatorias (Korn et al., 2009; Oukka, 2008). Se ha descrito que para su diferenciación requieren del factor de transcripción ROR $\gamma$ t (del inglés *retinoic acid receptor-related orphan receptor- $\gamma$* ) y de TGF $\beta$  combinado con IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 e IL-21 (Miossec et al., 2009), y para llevar a cabo su función van a secretar diferentes citoquinas como IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (**Figura 6**). Además, van a expresar en su superficie el IL-23R, el receptor de lectina CD161 (Cosmi et al., 2008) y pueden coexpresar los receptores de quimioquinas CCR4 y CCR6 (del inglés *Chemokine Receptor 4* or *Chemokine Receptor 6*) (Acosta-Rodriguez et al., 2007).

La posibilidad de que las células Th17 pudieran transformarse *in vitro* e *in vivo* en células Th17/Th1 estaría indicando un grado plasticidad de esta subpoblación de células T (Nistala et al., 2010). En relación con esto, algunos estudios han demostrado dicha plasticidad de las células Th17 ya que se han detectado células T en sangre periférica con capacidad de producir al mismo tiempo IL-17 e IFN $\gamma$  y que coexpresarían los factores de transcripción ROR $\gamma$ t y T-bet característicos de células Th17 y Th1, respectivamente (Annunziato et al., 2007). Además, se ha descrito la existencia de linfocitos Th17/Th2 humanos, originados a partir de células Th17 expuestas a IL-4. Estas células Th17/Th2 son capaces de producir IL-4, IL-5 e IL-13 además de IL-17, IL-8 e IL-22 y de inducir *in vitro* la producción de IgE, confirmando así que exhiben propiedades funcionales tanto de linfocitos Th17 como de Th2 (Cosmi et al., 2010).

Gran parte de las funciones patógenas de las células Th17 se atribuyen a la secreción de IL-17, incluyendo el reclutamiento de neutrófilos, la activación de células del sistema inmune innato, el aumento de las funciones de células B y la inducción de la liberación de

citoquinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$ , GM-CSF (del inglés *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*) e IL-1 $\beta$  (Fossiez et al., 1998; Jovanovic et al., 1998). Como ya se ha mencionado, se ha descrito que las citoquinas IL-17A e IL-17F son similares en su actividad biológica y van a representar un papel importante en la respuesta inflamatoria. La IL-17A induce la producción del ligando de quimioquina 8 o CXCL8 (del inglés *CXC-Ligand 8*), también conocido como IL-8, a partir de células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos y macrófagos lo que va a conducir al reclutamiento de neutrófilos (**Figura 7**). Además, en los tejidos inflamados crónicamente varios tipos celulares van a producir CCL20 (del inglés *Chemokine Ligand 20*) en respuesta a IL-17, que se va a unir al receptor CCR6 que estará altamente expresado en células Th17, permitiendo la atracción y reclutamiento de estas células al lugar inflamatorio (**Figura 7**). Como se ha mencionado anteriormente, las células Th17 también van a producir otras citoquinas como IL-21, IL-22 e IL-26. La citoquina IL-21 va a regular la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> a Th17 de una manera autocrina, amplificando así la respuesta Th17 (Nurieva et al., 2007). Por otro lado, la IL-22 está regulada positivamente en los procesos inflamatorios crónicos y puede provocar inflamación dérmica y acantosis (Zheng et al., 2007), pero esta citoquina también es producida independientemente por células T CD4<sup>+</sup> denominadas Th22 (Eyerich et al., 2009) (**Figura 6**). La citoquina IL-26 es producida tanto por células Th1 como Th17 y probablemente juega un papel importante en la inflamación intestinal (Dambacher et al., 2009). Por último, las células Th17 humanas también producen TNF $\alpha$  y GM-CSF que van a contribuir a la activación, supervivencia y reclutamiento de neutrófilos (Pelletier et al., 2010) (**Figura 7**).



**Figura 7. Citoquinas y quimioquinas producidas por las células Th17 humanas y sus dianas celulares.** Las células Th17 producen diferentes citoquinas y quimioquinas que van a activar células del sistema inmune y no-inmune. Las citoquinas IL-17A e IL-17F van a inducir a las células epiteliales, endoteliales y fibroblastos a producir CXCL8 que va a ser crucial en el reclutamiento de neutrófilos. Un efecto similar es inducido por IL-22 e IL-26 en células epiteliales. Además, las células Th17 también son capaces de reclutar neutrófilos gracias a la producción directa de CXCL8 y GM-CSF, o mediante la producción de CXCL8 por macrófagos a través de la actividad combinada de IL-17A, IL-17F y GM-CSF. Por otro lado, IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26 también van a estimular a células epiteliales para producir CCL20 que dará como resultado el reclutamiento de células Th17. Por último, IL-21 va a activar a células NK, células T CD8+ y células B, además de regular la diferenciación de las células Th17 de una manera autocrina. IL: InterLeuquina, CXCL8: del inglés *CXC-Ligand 8*, GM-CSF: del inglés *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*, CCL20: del inglés *Chemokine Ligand 20*, células NK: células *Natural Killer*. (Adaptado de Annunziato F. y col., 2012).

En relación con la posible implicación de las células Th17 en diferentes enfermedades humanas, numerosos datos experimentales indican que la IL-17 podría estar implicada no sólo en AR, sino también en EspA (Lubberts, 2010). Inicialmente se estableció que la IL-17 desempeñaba un papel importante en la patogenia de la artritis inflamatoria en modelos animales puesto que ratones deficientes en IL-17 mostraban una forma de CIA (del inglés *Collagen Induced Arthritis*) notablemente atenuada (Nakae et al., 2003). Además, la neutralización de IL-17 durante la inducción de artritis por adyuvante en ratas suprimía la aparición de la enfermedad (Bush et al., 2002) y la terapia anti-IL-17 en CIA establecida reducía significativamente la severidad de la enfermedad (Lubberts et al., 2004). Observaciones más recientes indican que en un modelo murino la anquilosis articular se asocia significativamente con el número de células T productoras de IL-17 de

los nódulos linfoides poplíteos (Abe et al., 2009) y que en ratas transgénicas HLA-B27 propensas a padecer EspA las células Th17 estarían aumentadas (Glatigny et al., 2012). Además, el bloqueo de IL-17 mejoraba tanto la aparición de anquilosis tarsal en un modelo murino (Ebihara et al., 2015) como la uveítis en ratones con artritis y espondilitis inducida por proteoglicanos (Kezic et al., 2012).

En cuanto al estudio de este tipo celular en humanos, varios autores han detectado niveles elevados de IL-17 y células Th17 en sangre periférica y líquido sinovial de pacientes con EspA (Bowness et al., 2011; Jandus et al., 2008; Leipe et al., 2010; Romero-Sanchez et al., 2011; Shen et al., 2009a; Singh et al., 2007; Wang et al., 2009b). Por otro lado, como ya se ha comentado en el apartado 2.4, paradójicamente la EA parece estar asociada con polimorfismos genéticos del IL-23R cuya variante “protectora” R381Q se caracterizaría por una respuesta Th17 disminuida (Di Meglio et al., 2011; Sarin et al., 2011). Por último, actualmente un anticuerpo monoclonal (mAb, del inglés *monoclonal Antibody*) anti-IL-17A denominado secukinumab está mostrando resultados prometedores como nueva diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la EA (Baeten et al., 2013, 2015a, 2015b; Braun et al., 2015).

Con todos estos antecedentes que relacionan las células Th17 con EspA y teniendo en cuenta que no hay estudios realizados en EspA no radiológica de reciente comienzo (EspA0-nr) debido en parte a que la definición de criterios de clasificación apropiados es muy reciente (Rudwaleit et al., 2011), nos propusimos analizar este tipo celular en pacientes con EA establecida y con EspA0-nr para poder esclarecer lo que sucede en etapas iniciales de la enfermedad.

### 3.5 Th22

Este tipo celular, que inicialmente se asoció con enfermedades de la piel (Duhon et al., 2009; Nogales et al., 2009), representa una subpoblación diferente de células T *helper* con expresión de genes y funciones diferentes al resto que se va a caracterizar por la producción de IL-22 (Trifari et al., 2009) (**Figura 6**). Aunque no se ha identificado un factor de transcripción para el desarrollo de estas células, algunos autores han descrito que el AHR (del inglés *Aryl Hydrocarbon Receptor*) sería importante para la producción de IL-22 (Trifari et al., 2009). En cuanto al papel que desempeñaría este tipo celular en la patogenia de diferentes enfermedades, se ha observado que podría ser importante puesto

que se ha detectado un incremento de la frecuencia de células Th22 en sangre periférica de pacientes con esclerosis múltiple (Xu et al., 2013), AR y EA (Zhang et al., 2012; Zhao et al., 2013) entre otras enfermedades, y dichos niveles se correlacionaban con el índice de la enfermedad en el caso de la AR (Zhang et al., 2011).

### 3.6 Th9

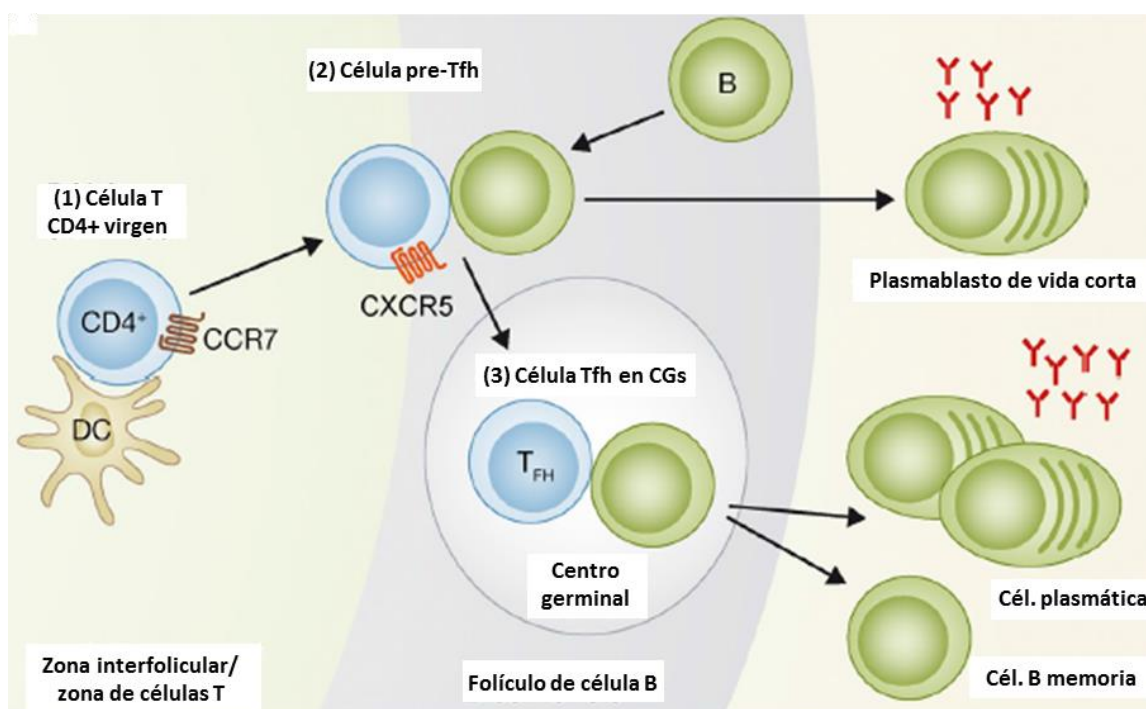
Las células Th9 se han asociado con la inmunopatología del asma y con inmunidad frente a parásitos. El desarrollo de estas células se genera gracias a la acción de TGF $\beta$  e IL-4 (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). Además, se ha propuesto que el factor de transcripción PU.1 o también llamado Spi-1 (del inglés *SFFV proviral integration-1*) es el principal factor requerido durante su diferenciación (Chang et al., 2010) y se van a caracterizar por la producción de IL-9 (Schmitt et al., 1994).

Varios estudios demuestran la implicación de las células Th9 en la patogenia de la EAE ya que se ha observado que ratones *knockout* para IL-9 desarrollaban una enfermedad menos severa que ratones *wild-type* (Li et al., 2011). Además, en pacientes con LES se ha descrito un aumento de los niveles de IL-9 en suero y del porcentaje de células T CD4+IL-9+ en sangre periférica, correlacionándose con la actividad y severidad de la enfermedad (Ouyang et al., 2013).

### 3.7 Tfh

Las células Tfh son una subpoblación de células T CD4+ que va a proporcionar ayuda a los linfocitos B en su diferenciación y función frente a enfermedades infecciosas o inmunización, promoviendo su maduración y la producción de anticuerpos (Fazilleau et al., 2009; King et al., 2008) (**Figura 6**). Este contacto entre células Tfh y linfocitos B dará lugar a la formación de centros germinales (CGs), estructuras localizadas en los órganos linfoides secundarios (amígdalas, ganglios linfáticos, bazo, etc.) donde acontece la expansión clonal, hipermutación somática, maduración de afinidad y desarrollo de células B de memoria y de células plasmáticas de vida larga que generarán anticuerpos. Además, también darán lugar a la formación de focos extrafoliculares (localizados en la pulpa roja del bazo o en los cordones medulares de los ganglios linfáticos, por ejemplo) donde se producirá la generación de células plasmáticas de vida corta que secretarán anticuerpos (Craft, 2012) (**Figura 8**).

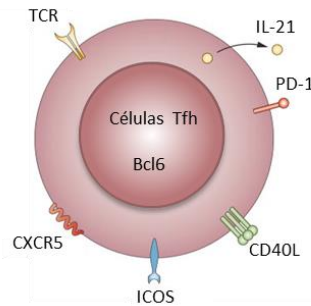




**Figura 8. Desarrollo de células Tfh e interacción entre célula Tfh y célula B en los CGs.** (1) Las células T CD4+ vírgenes se activan en las zonas interfoliculares o zonas de células T de los tejidos linfoides después del reconocimiento de péptidos a través de MHC de clase II de las células dendríticas. Estas células dendríticas proporcionan señales que aumentan la expresión de CXCR5 y disminuyen la expresión de CCR7 en las células T CD4+ que les va a permitir migrar a los folículos de células B. (2) Las células pre-Tfh interactúan con las células B activadas por antígeno que habrán migrado hacia la zona de células T. Como consecuencia de esta interacción, las células pre-Tfh proporcionan ayuda a las células B dando como resultado su diferenciación a plasmablastos extrafoliculares de vida corta que generarán anticuerpos, o a su migración en los folículos para formar los CGs. La continua estimulación y presentación de antígeno por las células B conduce al pleno desarrollo de células Tfh. (3) Dentro de los CGs, las células Tfh continúan proporcionando ayuda a las células B que darán lugar a células B de memoria y a células plasmáticas de vida larga que producirán anticuerpos. CXCR5: del inglés *CXC-chemokine Receptor 5*, CCR7: del inglés *Chemokine Receptor 7*, CGs: Centros Germinales. (Adaptado de Ma C.S., 2012).

Las células Tfh de los CGs expresan el receptor de quimioquinas CXCR5 (del inglés *CXC-chemokine receptor 5*) que guiará la migración a los folículos de células B (Breitfeld et al., 2000; Kim et al., 2001; Rasheed et al., 2006; Schaerli et al., 2000) (**Figura 9**). También expresan en su superficie CD40 ligando (CD40L) que va a proporcionar señales a las células B a través de CD40 induciendo su diferenciación y cambio de isotipo (Banchereau et al., 1994). Además, van a expresar la molécula ICOS (del inglés *Inducible CO-Stimulator*) que es esencial para la generación de las células Tfh ya que se ha visto que en ratones y humanos con déficit en ICOS se generaban CGs hipocelulares con escasas células Tfh (Akiba et al., 2005; Bossaller et al., 2006; Choi et al., 2011). También van a expresar el receptor inhibidor inmune PD-1 (del inglés *Programmed Death-1*) que va a regular la actividad de estas células en los CGs (Cubas et al., 2013). Se caracterizan por expresar el factor de transcripción Bcl-6 (del inglés *B cell lymphoma-6*) que es esencial

para la generación de las células Tfh (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). Por último, estas células van a secretar IL-21 que es esencial para el desarrollo y mantenimiento de los CGs y para el desarrollo de células productoras de anticuerpos (Zotos et al., 2010). Además, junto con la IL-4, la IL-21 va a promover la diferenciación y el cambio de isotipo de las células B (Craft, 2012) (**Figura 9**).



**Figura 9. Características de las células Tfh de los CGs.** Las células Tfh se caracterizan por expresar el factor de transcripción Bcl-6, las moléculas de superficie CXCR5, ICOS, PD-1 y CD40L, y por secretar la citocina IL-21. (Adaptado de Craft J.E., 2012).

La biología de las células Tfh en los órganos linfoides ha sido muy estudiada durante la pasada década sobre todo en modelos murinos. Por el contrario, en el caso de los humanos, el estudio de células Tfh ha sido limitado debido a las dificultades encontradas para poder realizar la investigación y manipulación de estas células pertenecientes a los órganos linfoides secundarios, ya que sólo existen dos fuentes principales de células Tfh humanas en investigación: las amígdalas de niños que han sufrido infecciones recurrentes de garganta y el bazo de donantes de órganos. Por este motivo, es de gran interés el estudio de este tipo celular en sangre periférica. En 1994, se describió por primera vez la presencia de células T CD4<sup>+</sup> que expresaban CXCR5 en sangre periférica humana (Förster et al., 1994), pero la biología de estas células circulantes no ha sido bien caracterizada hasta los últimos años. Recientemente, algunas investigaciones han demostrado que dichas células representarían un tipo de células T de memoria circulantes procedentes del linaje de células Tfh clásicas de los CGs y serían capaces de ayudar a los linfocitos B en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas (Igs) y en su diferenciación a célula plasmática (Boswell et al., 2014; Chevalier et al., 2011; He et al., 2013; Locci et al., 2013; Morita et al., 2011).

Estas células T CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> de sangre periférica constituyen aproximadamente el 20-25% de las células T CD4<sup>+</sup> de memoria en humanos (Chevalier et al., 2011) y se diferencian de las células Tfh típicas de los CGs por la ausencia del factor de transcripción Bcl-6, sugiriendo que dicho factor no sería necesario para el mantenimiento de estas

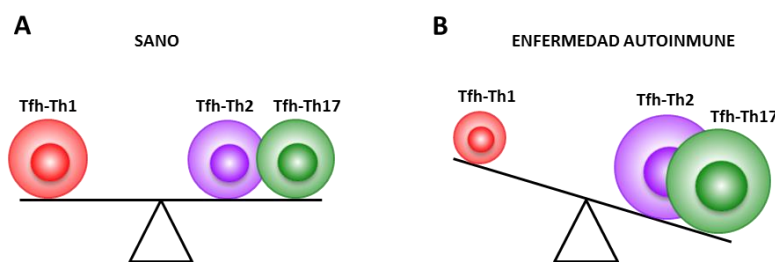


células (Schmitt et al., 2014). Además, algunas células T CD4+CXCR5+ de sangre periférica expresan las moléculas ICOS y/o PD-1. De esta forma, algunos autores han descrito que la frecuencia de células Tfh circulantes, definida como CXCR5+ICOS<sup>high</sup>PD-1<sup>high</sup> se encontraba aumentada en sangre periférica de pacientes con LES y síndrome de Sjögren (Simpson et al., 2010). Asimismo, otros investigadores han detectado un aumento de células Tfh circulantes definidas como CD4+CXCR5+ICOS<sup>high</sup> en pacientes con LES y síndrome de Sjögren (Simpson et al., 2010) y en pacientes con tiroiditis de Hashimoto (Zhu et al., 2012) que se correlacionaban positivamente con los niveles de autoanticuerpos en suero. Además, se ha descrito que las células Tfh que expresaban CD4+CXCR5+ICOS+ se encontraban aumentadas en sangre periférica de pacientes con esclerosis múltiple independientemente de la actividad y se correlacionaban positivamente con la progresión de la enfermedad (Romme Christensen et al., 2013). Del mismo modo, otros autores han detectado un aumento de células Tfh que expresaban CD4+CXCR5+ICOS+PD-1+ en sangre periférica de pacientes con síndrome de Sjögren y se correlacionaba con los niveles de anticuerpos en suero de estos pacientes (Szabo et al., 2013). Estas cuatro clasificaciones de las células Tfh según la expresión de ICOS y/o PD-1 definen a los homólogos circulantes de las células Tfh clásicas o típicas de los CGs, que denominaremos células Tfh circulantes o cTfh.

Por otro lado, Morita y col. (Morita et al., 2011) describieron tres poblaciones de células Tfh en células T CD4+CXCR5+ de sangre periférica según la expresión diferencial de CCR6 y/o CXCR3, detectando así las siguientes poblaciones: células CD4+CXCR5+CXCR3+CCR6- que expresarían el factor de transcripción T-bet y producirían citoquinas características de Th1 (IFN $\gamma$ ), por lo que se las llamaría células Tfh-Th1; células CD4+CXCR5+CXCR3-CCR6- que expresarían el factor de transcripción GATA-3 y producirían citoquinas de Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), y se las denominaría células Tfh-Th2; y por último, células CD4+CXCR5+CXCR3-CCR6+ que expresarían el factor de transcripción ROR $\gamma$ t y producirían citoquinas de Th17 (IL-17 e IL-22), por lo que recibirían el nombre de células Tfh-Th17 (Morita et al., 2011). Además, estos autores demostraron de una manera muy elegante que las células Tfh-Th2 y Tfh-Th17, pero no las células Tfh-Th1, eran capaces de inducir la producción de Igs y el cambio de isotipo de las células B vírgenes, a través de la secreción de IL-21. De este modo, y siguiendo estos criterios, las células cTfh se subdividirían en células “eficaces (Tfh-Th2 y Tfh-Th17)” y

“no eficaces (Tfh-Th1)” según su capacidad de ayudar o no a las células B, respectivamente.

En base a los datos de Morita y col., varios estudios han demostrado que una alteración en el balance de células Tfh-Th1, Tfh-Th2 y Tfh-Th17 en sangre periférica estaría asociado con la patogenia de enfermedades autoinmunes como LES (Le Coz et al., 2013), síndrome de Sjögren (Li et al., 2012) y esclerosis múltiple (Romme Christensen et al., 2013), donde las células Tfh-Th1 se encontrarían disminuidas y las células con capacidad de ayudar a los linfocitos B (Tfh-Th2 y Tfh-Th17) estarían aumentadas (**Figura 10**). Además, en estos estudios encontraron que dichas alteraciones se correlacionaban con la actividad de la enfermedad, los títulos de autoanticuerpos en suero y/o la frecuencia de plasmablastos en sangre periférica de pacientes. Por lo tanto, una disminución de la subpoblación Tfh-Th1 y un incremento de Tfh-Th2 y Tfh-Th17 en células cTfh serían un reflejo del aumento global de las células “eficientes” que promoverían la generación de anticuerpos en los órganos linfoides y/o sitios inflamatorios en pacientes con enfermedades autoinmunes.



**Figura 10. Balance de las subpoblaciones de células Tfh descritas por Morita y col. en sangre periférica. (A)** Balance de las subpoblaciones de células Tfh en sujetos sanos. **(B)** Balance de las subpoblaciones de células Tfh en pacientes con enfermedad autoinmune. (Adaptado de Morita R. y col., 2011).

En el caso de las EspA, el papel de las células B y de la inmunidad humoral no está claro (Sahly et al., 1998; Tiwana et al., 1998), pero algunos autores han encontrado un aumento del número de linfocitos B CD5+ en EspA (Cantaert et al., 2012) y se ha descrito que algunos pacientes con EA podrían beneficiarse de estrategias terapéuticas en las que se deplecionan las células B (Song et al., 2010). Por otro lado, varios autores han encontrado autoanticuerpos en pacientes con estas enfermedades (Chou et al., 2010; Duftner et al., 2006; Georgopoulos et al., 1985; Wang et al., 2011; Wright et al., 2012), aunque su baja sensibilidad o especificidad no han permitido establecer de momento una clara asociación patogénica.

Recientemente, un grupo alemán se centró en el estudio de la molécula CD74, también conocida como cadena invariante de la molécula MHC-II, que parece estar implicada en la prevención de la unión prematura de péptidos a la molécula MHC-II, además de influir en la diferenciación de las células B. Estos autores encontraron anticuerpos frente a CD74 en el suero de pacientes con EspA axial y propusieron que esta molécula podría utilizarse como un nuevo marcador para el diagnóstico de estas enfermedades (Baerlecken et al., 2014; Baraliakos et al., 2014).

Con estos antecedentes, quisimos investigar sobre el posible papel de las células Tfh en la patogenia de la EA.

## 4. TRATAMIENTOS EN EspA

---

Existen diferentes tratamientos para mejorar la calidad de vida de los pacientes con EspA:

### 4.1 Tratamiento no biológico

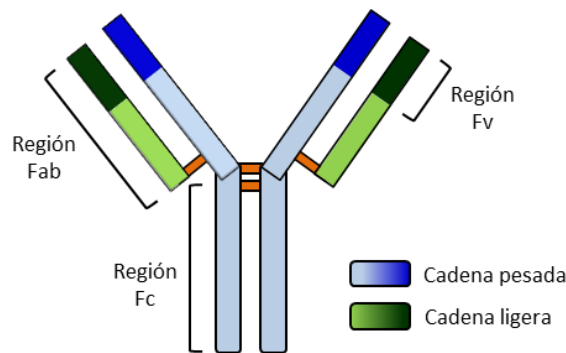
El tratamiento convencional inicial para reducir el dolor y la rigidez en los pacientes con EspA suele ser el tratamiento farmacológico con los denominados AINEs (Anti-Inflamatorios No Esteroideos), suplementado con modalidades no farmacológicas como fisioterapia y natación (Zochling et al., 2006). Cuando después del uso de dos AINEs diferentes durante al menos cuatro semanas en total, la actividad de la enfermedad persiste (definida por BASDAI  $\geq 4$ ), se debe considerar el cambio a una terapia biológica (van der Heijde et al., 2011).

### 4.2 Tratamiento biológico

Durante las últimas dos décadas, la quimerización y humanización de los mAb (del inglés *monoclonal Antibody*) ha permitido la creación de nuevos fármacos biológicos que se caracterizan por utilizar el papel central que los Ab juegan en el sistema inmune adaptativo para el reconocimiento y neutralización de antígenos (Willrich et al., 2015).

La estructura básica de los mAb terapéuticos se basa en la estructura general de las Igs, formadas por 4 cadenas de polipéptidos que incluyen 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras idénticas. Funcionalmente, los Ab se dividen en dos regiones: una región de unión

al antígeno o región Fab (del inglés *Fragment antigen binding*) y una región constante o región Fc (del inglés *Fragment crystallizable*). La zona de reconocimiento del antígeno localizada dentro del fragmento Fab recibe el nombre de zona variable o Fv (del inglés *Fragment variable*) donde se van a encontrar las regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDRs del inglés *Complementarity Determining Region*) que son las responsables de la unión al antígeno y van a estar separadas por regiones altamente conservadas denominadas Frs (del inglés *Framework regions*). Además, las regiones Fc van a permitir que otras células del sistema inmune reconozcan al Ab (Willrich et al., 2015) (**Figura 11**).

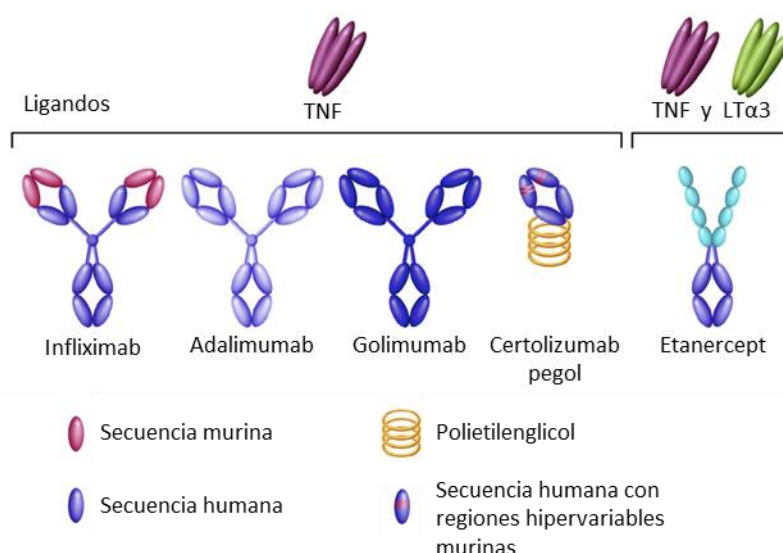


**Figura 11. Estructura de un anticuerpo (Ab).** Los Ab están formados por 4 cadenas: 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras. Funcionalmente, los Ab se dividen en dos regiones: una región de unión al antígeno o región Fab formada por la región variable o región Fv donde se localizan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) que son las responsables de la unión al Ag, y una región constante o región Fc que permite que otras células del sistema inmune reconozcan al Ab. (Adaptado de <http://www.onclive.com>).

Los mAb están diseñados para reconocer, inhibir o eliminar proteínas humanas implicadas en los procesos inflamatorios de las enfermedades. El TNF $\alpha$  es un ejemplo de ello ya que es una citoquina con funciones pro-inflamatorias e inmunoregulatoras (Willrich et al., 2015). Desde hace más de una década, la terapia anti-TNF ha revolucionado el tratamiento de pacientes con diferentes enfermedades reumatológicas (Taylor, 2010) y entre ellas las EspA (Braun and Sieper, 2002). Hoy en día existen cinco fármacos inhibidores del TNF: infliximab (IFX), adalimumab (ADA), golimumab (GOL), certolizumab (CZP) y etanercept (ETN), que difieren en su estructura molecular y la vía de administración, y han sido aprobados para estas enfermedades en caso de una falta de respuesta a otras terapias (**Tabla 1 y Figura 12**).

	<b>Infliximab</b>	<b>Adalimumab</b>	<b>Golimumab</b>	<b>Certolizumab</b>	<b>Etanercept</b>
<b>Estructura del anticuerpo</b>	mAb quimérico	mAb humano	mAb humano	mAb humanizado	Proteína de fusión humana
<b>Región variable (Fab) + región constante (Fc)</b>	Fab murino + Fc humano	Fab humano + Fc humano	Fab humano + Fc humano	Fab humanizado unido a polietilenglicol	Dominio extracelular del receptor 2 del TNF (TNFR2) + Fc humano
<b>Diana del anticuerpo</b>	TNF $\alpha$ soluble y de membrana	TNF $\alpha$ soluble y de membrana	TNF $\alpha$ soluble y de membrana	TNF $\alpha$ soluble y de membrana	TNF $\alpha$ soluble y de membrana y TNF $\beta$ (linfotóxina $\alpha$ o LT $\alpha$ 3)
<b>Vía de administración</b>	Intravenosa	Subcutánea	Subcutánea	Subcutánea	Subcutánea

**Tabla 1. Inhibidores del TNF.** mAb: anticuerpo monoclonal.



**Figura 12. Inhibidores de TNF.** Infliximab es un anticuerpo quimérico con secuencias de aminoácidos murinos en la región Fab. Adalimumab y Golimumab son totalmente humanos. Certolizumab pegol es un fragmento Fab humanizado unido a polietilenglicol. Etanercept es una proteína de fusión entre el dominio extracelular del receptor 2 del TNF (TNFR2) y la porción Fc de una IgG1 humana. Los 5 mAb van a neutralizar tanto al TNF $\alpha$  soluble como al de membrana, mientras que Etanercept se va a unir también a TNF $\beta$  o linfotóxina  $\alpha$  (LT $\alpha$ 3). (Adaptado de Willrich M. y col., 2015).

Los cinco mAb neutralizan tanto al TNF $\alpha$  soluble como al de membrana, mientras que tan solo ETN es capaz de unirse a TNF $\beta$  (linfotóxina  $\alpha$  o LT $\alpha$ 3) (Gottlieb, 2007; Tracey et al., 2008) (**Tabla 1 y Figura 12**). Estas uniones impiden las interacciones del TNF con sus receptores en las células inflamatorias. El proceso de unión de estos fármacos al TNF se conoce como neutralización del TNF (Raza, 2000) y esta neutralización va a provocar la supresión de citoquinas inflamatorias como IL-1 e IL-6 y de moléculas de

adhesión que median la activación y migración de los leucocitos. De esta forma, dicha supresión va a ayudar a la inhibición de los procesos inflamatorios (Kirman et al., 2004).

Aunque el tratamiento de los pacientes con EspA ha mejorado enormemente desde hace más de 10 años con la introducción de los bloqueantes del TNF (Brandt et al., 2000; Van den Bosch et al., 2000), existe una gran necesidad de nuevas alternativas terapéuticas ya que se sabe que hasta un 40% de estos pacientes no responden correctamente al tratamiento convencional con bloqueantes del TNF, ya sea por intolerancia o por ineficacia. Por otra parte, en pacientes en los que el bloqueo de TNF es eficaz, se ha observado que es necesario continuar dicho tratamiento para mantener la remisión de la actividad de la enfermedad (Baraliakos et al., 2005; Paramarta et al., 2013b; Song et al., 2012). Por último, incluso cuando los síntomas clínicos y la inflamación están completamente suprimidos, el bloqueo del TNF no parece detener la formación de hueso nuevo (Dougados and Baeten, 2011). Por lo tanto, teniendo en cuenta la necesidad médica de nuevas dianas terapéuticas en EspA, varias líneas de investigación han sugerido que el eje IL-23/IL-17 podría ser una prometedora diana terapéutica para el tratamiento de estos pacientes.







## **II. OBJETIVOS**

---



Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, nos propusimos estudiar la biología de varias subpoblaciones de células T CD4+ en Espondiloartritis, con los siguientes objetivos concretos:

**A. OBJETIVOS DEL ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS  
CÉLULAS Th17 EN PACIENTES CON ESPONDILOARTRITIS  
AXIAL NO RADIOLÓGICA DE RECIENTE COMIENZO Y  
ESPONDILITIS ANQUILOSANTE ESTABLECIDA**

- Investigar la frecuencia y fenotipo de las células Th17 en sangre periférica de pacientes con EspA0-nr y EA.
- Determinar la posible relación entre las células Th17 y los parámetros clínicos en pacientes con EspA0-nr y EA.

**B. OBJETIVOS DEL ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS  
CÉLULAS Tfh EN PACIENTES CON ESPONDILITIS  
ANQUILOSANTE ESTABLECIDA**

- Examinar la frecuencia y fenotipo de las células Tfh circulantes (cTfh), de las subpoblaciones de cTfh y de plasmablastos circulantes en pacientes con EA.
- Estudiar la capacidad funcional *ex vivo* de las células T CD4+CXCR5+ en pacientes con EA que no estaban recibiendo tratamiento con bloqueantes del TNF (EA/nb).
- Analizar los niveles de inmunoglobulinas en suero de pacientes con EA.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## 1. PACIENTES

---

En este apartado describiremos las características más relevantes de los pacientes que han participado en cada estudio realizado en esta Tesis. Todos ellos firmaron el consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

### 1.1 Características de los pacientes con EspA0-nr y EA que donaron sangre periférica para realizar el estudio sobre células Th17

En primer lugar, para llevar a cabo el estudio sobre células Th17 obtuvimos sangre periférica de:

- 30 pacientes con EspA0-nr
- 11 pacientes con EA
- 41 sujetos sanos pareados para edad y sexo

Todos los pacientes con EspA0-nr que participaron en este estudio cumplían los criterios ASAS para la clasificación de las EspA (Rudwaleit et al., 2011). Además, para la inclusión de dichos pacientes fue necesario que cada uno de ellos presentara lumbalgia inflamatoria o artritis periférica asimétrica, que la duración de la enfermedad estuviese comprendida entre 3 y 24 meses, que su edad no fuera menor de 18 años ni mayor de 45 años, y que ninguno de ellos hubiese recibido nunca ningún FAME (Fármaco Antirreumático Modificador de la Enfermedad), corticosteroides o tratamiento biológico. Todos los pacientes fueron atendidos en el Hospital Universitario La Paz de Madrid y estaban incluidos en el programa “Esperanza” de la Fundación Española de Reumatología. En la visita basal de cada uno de ellos se realizó la historia clínica, exploración física, radiología convencional de pelvis, y se recogieron los siguientes datos clínicos para cada uno de los pacientes EspA0-nr: índice de actividad de la enfermedad medido por BASDAI (del inglés *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*), índice funcional de la enfermedad medido por BASFI (del inglés *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*), VSG (Velocidad de Sedimentación Globular), PCR (Proteína C Reactiva), ASDAS-VSG (del inglés *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-VSG*), ASDAS-PCR (del inglés *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-PCR*), ASQOL (del inglés *Ankylosing Spondylitis Quality of Life*), evaluación global del paciente y la molécula HLA-B27. Las características clínicas de estos pacientes se resumen en la **Tabla 2**. Además, en la **Tabla 3**

se muestran los criterios ASAS que cumplían los pacientes con EspA0-nr HLA-B27- y HLA-B27+, respectivamente.

	EspA0-nr (n=30)	EA (n=11)
<b>Edad (años); mediana (RIQ)</b>	35,6 (31,3-41)	46 (43-59)
<b>Hombres; n° (%)</b>	21 (70)	10 (91)
<b>HLA-B27+; n° (%)</b>	15 (50)	10 (91)
<b>Duración enfermedad (años); mediana (RIQ)</b>	1,1 (0,7-1,5)	23 (12-27)
<b>Tratamiento: AINEs / anti-TNF</b>	30 / 0	2 / 9
<b>BASDAI; mediana (RIQ)</b>	3,9 (2,8-4,8)	2,6 (1,3-6,1)
<b>BASFI; mediana (RIQ)</b>	1,8 (0,5-4,9)	3 (0,6-5,8)
<b>ASDAS-VSG; mediana (RIQ)</b>	2,14 (1,89-2,72)	2,22 (1,41-3,15)
<b>ASDAS-PCR; mediana (RIQ)</b>	2,55 (1,9-3,13)	2,34 (1,07-3,02)
<b>PCR; mediana (RIQ)</b>	7,37 (2,51-11,1)	4,52 (1,44-15,4)
<b>Evaluación global del paciente; mediana (RIQ)</b>	3 (2-6)	3 (2-6,5)

**Tabla 2. Características clínicas de los pacientes con EspA0-nr y EA.** EspA0-nr: pacientes con Espondiloartritis axial no radiológica de reciente comienzo, EA: pacientes con Espondilitis Anquilosante establecida, RIQ: rango intercuartil, HLA-B27: del inglés *Human Leukocyte Antigen-B27*, AINEs: AntiInflamatorios No Esteroideos, TNF: del inglés *Tumor Necrosis Factor*, BASDAI: del inglés *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*, BASFI: del inglés *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*, ASDAS-VSG: del inglés *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-Velocidad de Sedimentación Globular*, ASDAS-PCR: del inglés *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-PCR*, PCR: Proteína C Reactiva.

	EspA0-nr HLA-B27- (n=15)	EspA0-nr HLA-B27+ (n=15)
<b>Sacroileítis definida – criterios mod. NY</b> (van der Linden et al., 1984)	0	0
<b>Sacroileítis en IRM</b>	15	7
<b>Dolor espalda inflamatorio</b>	15	15
<b>Artritis</b>	5	5
<b>Entesitis (talón)</b>	1	2
<b>Uveitis</b>	2	1
<b>Dactilitis</b>	0	0
<b>Psoriasis</b>	0	0
<b>Enfermedad de Crohn / colitis ulcerosa</b>	0	0
<b>Buena respuesta a AINEs</b>	10	13
<b>Antecedentes familiares de EspA</b>	4	5
<b>HLA-B27</b>	0	15
<b>PCR elevada</b>	0	3

**Tabla 3. Criterios de clasificación ASAS para EspA axial** (Rudwaleit et al., 2011) **en 30 pacientes con EspA0-nr.** EspA0-nr: pacientes con Espondiloartritis no radiológica de reciente comienzo, NY: Nueva York, IRM: Imagen por Resonancia Magnética, AINEs: AntiInflamatorios No Esteroideos, HLA-B27: del inglés *Human Leukocyte Antigen-B27*, PCR: Proteína C Reactiva.

Por otro lado, en este estudio también participaron 11 pacientes con EA establecida que cumplían los criterios de clasificación de Nueva York (van der Linden et al., 1984). De



estos pacientes, dos de ellos sólo tomaban AINEs y nueve estaban recibiendo tratamiento con bloqueantes del TNF (**Tabla 2**). En estos últimos pacientes, cabe destacar que la sangre fue obtenida inmediatamente antes de la nueva infusión/administración del tratamiento con bloqueantes del TNF para evitar un enmascaramiento de los resultados por el efecto inmediato de la nueva infusión del tratamiento. Asimismo, se recogieron los siguientes datos clínicos para cada uno de los pacientes con EA establecida: BASDAI, BASFI, VSG, PCR, ASDAS-VSG, ASDAS-PCR, evaluación global del paciente y HLA-B27 (**Tabla 2**).

Destacar que ninguno de los 41 pacientes que participaron en el estudio sobre células Th17 tenía asociado psoriasis, EII o alguna infección previa (**Tabla 3**).

## 1.2 Características de los pacientes con EA que donaron sangre periférica para realizar el estudio sobre células Tfh

Para la realización del estudio sobre células Tfh contamos con sangre periférica de:

- 25 pacientes con EA que no estaban recibiendo ningún tratamiento con bloqueantes del TNF (EA/nb)
- 25 pacientes con EA que estaban recibiendo tratamiento con bloqueantes del TNF (EA/b)
- 50 sujetos sanos pareados para edad y sexo

Todos los pacientes con EA que participaron en este estudio cumplían los criterios de Nueva York (van der Linden et al., 1984). Dentro del grupo de pacientes con EA/nb: 16 de ellos estaban tomando AINEs, 4 estaban recibiendo sulfasalazina (SSZ) y 5 de ellos no estaban tomando ninguna medicación regularmente (**Tabla 4**). En cuanto a los pacientes con EA/b: 20 estaban recibiendo IFX, 4 ETN y 1 ADA, y además, 7 de ellos estaban tomando AINEs y 8 estaban recibiendo SSZ (**Tabla 4**). Cabe destacar que en el caso de los pacientes con EA/b, la sangre fue obtenida inmediatamente antes de la nueva infusión/administración del tratamiento con bloqueantes del TNF para evitar un enmascaramiento de los resultados por el efecto inmediato de la nueva infusión del tratamiento. Además, se recogieron los siguientes datos clínicos para cada uno de los pacientes con EA: BASDAI, BASFI, VSG, PCR, ASDAS-VSG, ASDAS-PCR, evaluación global del paciente y HLA-B27. Las características clínicas de los pacientes con EA establecida que participaron en este estudio se resumen en las **Tablas 4 y 5**.

Destacar que un número reducido de pacientes que participaron en este estudio sobre células Tfh tenían asociado psoriasis o EII (**Tabla 4**).

	EA/nb (n=25)	EA/b (n=25)
<b>Edad (años); mediana (RIQ)</b>	56 (45,5-65,5)	53 (45-61,5)
<b>Hombres; n° (%)</b>	12 (48)	16 (64)
<b>HLA-B27+; n° (%)</b>	22 (88)	23 (92)
<b>Tiempo desde comienzo síntomas (años); mediana (RIQ)</b>	25,5 (17,5-35)	24,5 (14-36)
<b>Tiempo desde diagnóstico enfermedad (años); mediana (RIQ)</b>	11,5 (5,5-20)	15 (9-22,5)
<b>Tiempo en tratamiento con bloqueantes del TNF (años); mediana (RIQ)</b>	-	7 (5-9)
<b>Tratamiento</b>	16 AINEs, 4 SSZ, 5 nada	20 IFX, 4 ETN, 1 ADA; 7 AINEs, 8 SSZ
<b>BASDAI; mediana (RIQ)</b>	3,9 (2,8-4,8)	2,6 (1,3-6,1)
<b>BASFI; mediana (RIQ)</b>	1,8 (0,5-4,9)	3 (0,6-5,8)
<b>ASDAS-VSG; mediana (RIQ)</b>	2,14 (1,89-2,72)	2,22 (1,41-3,15)
<b>ASDAS-PCR; mediana (RIQ)</b>	2,55 (1,9-3,13)	2,34 (1,07-3,02)
<b>PCR; mediana (RIQ)</b>	7,37 (2,51-11,1)	4,52 (1,44-15,4)
<b>Evaluación global del paciente; mediana (RIQ)</b>	3 (2-6)	3 (2-6,5)
<b>Psoriasis</b>	2	1
<b>Enfermedad de Chron/colitis ulcerosa</b>	3	3
<b>Uveitis</b>	17	3
<b>Dactilitis</b>	1	1

**Tabla 4. Características clínicas de los pacientes con EA/nb y EA/b.** EA/nb: pacientes con EA establecida que no han recibido tratamiento con bloqueantes del TNF, EA/b: pacientes con EA establecida en tratamiento con bloqueantes del TNF, HLA-B27: del inglés *Human Leukocyte Antigen-B27*, TNF: del inglés *Tumor Necrosis Factor*, AINEs: AntiInflamatorios No Esteroides, SSZ: sulfasalazina, IFX: infliximab, ETN: etanercept, ADA: adalimumab, BASDAI: del inglés *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*, BASFI: del inglés *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*, ASDAS-VSG: del inglés *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-Velocidad de Sedimentación Globular*, ASDAS-PCR: del inglés *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-PCR*, PCR: Proteína C Reactiva, RIQ: rango intercuartil.

	ASDAS-PCR			
	<1,3 (enfermedad inactiva)	1,3-2,1 (actividad moderada)	2,1-3,5 (actividad alta)	>3,5 (actividad muy alta)
<b>EA/nb (n° de pacientes)</b>	2	7	13	3
<b>EA/b (n° de pacientes)</b>	7	1	13	4

**Tabla 5. Número de pacientes de acuerdo con el estado de actividad de la enfermedad basados en los valores de ASDAS-PCR** (Machado et al., 2011). EA/nb: pacientes con EA establecida que no han recibido tratamiento con bloqueantes del TNF, EA/b: pacientes con EA establecida en tratamiento con bloqueantes del TNF, ASDAS-PCR: del inglés *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-Proteína C Reactiva*.

## 2. CULTIVOS CELULARES

---

Los estudios fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Se utilizaron cultivos primarios de linfocitos T y linfocitos B.

### 2.1 Cultivos primarios

#### 2.1.1 Purificación de linfocitos T CD4+ y T CD4+CXCR5+

Las células mononucleares de sangre periférica o PBMCs (del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) fueron obtenidas mediante gradiente de densidad en Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). A continuación, purificamos células T CD4+ a partir de los PBMCs mediante separación magnética negativa utilizando “*CD4+ T cell isolation kit*” de Miltenyi Biotec, que contenía un cóctel de anticuerpos conjugados con biotina frente a CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR  $\gamma/\delta$  y CD235a (glicoforina A), así como microbolitas magnéticas anti-biotina. Los linfocitos T CD4+ obtenidos, libres de monocitos, células NK y células B presentaban una pureza mayor del 98%.

Finalmente, se aislaron las subpoblaciones de células T CD4+CXCR5+ y CD4+CXCR5- a partir de células T CD4+ totales, utilizando un anticuerpo anti-CXCR5 marcado en PE seguido por un marcaje con microbolitas magnéticas anti-PE (Miltenyi Biotec). Las subpoblaciones de células T CD4+ mostraron una pureza mayor del 98%.

#### 2.1.2 Purificación de linfocitos B CD19+ vírgenes y de memoria

Las células B CD19+ se purificaron a partir de PBMCs recién aislados mediante separación magnética negativa utilizando “*B cell isolation kit II*” de Miltenyi Biotec, que contenía un cóctel de anticuerpos conjugados con biotina frente a CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 y CD235a (glicoforina A), así como microbolitas magnéticas anti-biotina. Los linfocitos B CD19+ obtenidos, libres de monocitos, células NK y células T presentaban una pureza mayor del 98%.

Finalmente, a partir de las células B CD19+ totales, se aislaron células B vírgenes (CD19+CD27-) y células B de memoria (CD19+CD27+) mediante una selección magnética positiva, empleando anticuerpos anti-CD27 marcados con microbolitas

magnéticas (Miltenyi Biotec). Las subpoblaciones de células B mostraron una pureza mayor del 98%.

## 2.2 Condiciones de cultivo

Los cultivos celulares se realizaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa, en medio de cultivo RPMI 1640 (del inglés *Roswell Park Memorial Institute 1640*) (Lonza, Allendale, NJ, EEUU) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina, 50 U/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina y 50µM 2-mercaptoetanol (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY Carlsbad, CA) al que denominaremos “medio de cultivo completo”. Las placas de cultivo fueron de Corning (Cambridge, MA).

### 2.2.1 Cultivos de células T CD4+ en el estudio de células Th17

Para estudiar la frecuencia de las células Th17, inmediatamente después de la purificación, las células T CD4+ totales fueron cultivadas a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml en placas de 24 pocillos en medio de cultivo completo. Las células T fueron estimuladas durante 16 horas con PMA (del inglés *Phorbol Myristate Acetate*) 10nM e Ionomicina 2µM, en presencia o ausencia de monensina 4µM (todos de Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU). Además, las células T CD4+ totales fueron cultivadas durante 4 días en presencia de 0,5µg/ml de anti-CD3 soluble (T3/4.E, Sanquin, Amsterdam, The Netherlands, formerly Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service), 1µg/ml de anti-CD28 (BD Pharmingen, San Diego, CA, EEUU) y 1µg/ml de anti-CD49d (BD Pharmingen), y reestimuladas durante las últimas 6 horas con PMA e Ionomicina.

### 2.2.2 Cocultivos de células T/células B autólogas en el estudio de células Tfh

Para evaluar la capacidad funcional de las células T CD4+CXCR5+ circulantes, las células CXCR5+ obtenidas después de la purificación de las células T CD4+, fueron cocultivadas durante 13 días con células B vírgenes CD19+CD27- en placas de 96 pocillos con fondo en U (Corning, Cambridge, MA) en medio de cultivo completo. Estas subpoblaciones de células T y B se cocultivaron en una proporción 2:1 (2x10<sup>5</sup> células T por cada 1x10<sup>5</sup> células B por pocillo). Además, a los cocultivos se añadió 1µg/ml de Enterotoxina Estafilocócica B o SEB (del inglés *Staphylococcal Enterotoxin B*) (Sigma-Aldrich) ya que se ha demostrado que la producción de Igs en los cocultivos de células Tfh

con células B es dependiente de la interacción específica de antígenos entre las células T y las células B (Morita et al., 2011). El medio de cultivo se cambió cada 3 ó 4 días de la siguiente forma: se retiró el 50% de medio de cultivo de cada pocillo, se centrifugó y se guardó a -80°C. A continuación, a cada pocillo se añadió 50% de medio de cultivo completo nuevo. El día 13 se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron y se guardaron a -80°C para utilizarlos posteriormente para medir IgA, IgG e IgM mediante ELISA.

A su vez, como controles experimentales se establecieron cocultivos de células T CD4+CXCR5+ con células B de memoria CD19+CD27+ y cocultivos de células T CD4+CXCR5- con células B vírgenes o con células B de memoria.

### 3. CITOMETRÍA DE FLUJO

---

#### 3.1 Tinción de superficie

Para poder determinar la expresión de determinados marcadores fenotípicos de células T CD4+ en los pacientes con EspA0-nr, EA establecida y en los sujetos sanos del estudio sobre células Th17, se utilizaron anticuerpos conjugados directamente con fluorocromo frente a CD3, CD4, CD8, CCR6, CCR4, CD45RO, CD45RA, CD25 y CD127 (**Tabla 6**). Para ello se incubaron las células con los anticuerpos correspondientes durante 30 minutos, a 4°C y en oscuridad. Por otro lado, para detectar el IL-23R utilizamos un anticuerpo generado en cabra anti-humano IL-23R biotinilado (**Tabla 6**) durante 1 hora, a 4°C y en oscuridad, seguido por la incubación con avidina marcada con FITC durante 30 minutos, a 4°C y en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación con todos los anticuerpos, las células se lavaron con PBS que contenía 2% de SFB y 0,01% de azida sódica (PBS1x/2%SFB/0,01%NaN<sub>3</sub>), seguido por un lavado con PBS y resuspendidas en paraformaldehído al 1% (PFA al 1%). La expresión de los marcadores se determinó en un citómetro de flujo de cuatro colores FACSCalibur usando el programa CellQuest (BD Biosciences, San José, CA, EEUU).

Del mismo modo, para determinar la frecuencia y fenotipo de las células Tfh y de los plasmablastos presentes en sangre periférica de pacientes con EA establecida y de sujetos sanos se realizaron tinciones específicas que fueron analizadas mediante citometría de flujo después de teñir los PBMCs con diferentes marcadores de superficie durante 30 minutos, a 4°C y en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación con los anticuerpos conjugados

directamente con fluorocromo CD3, CD4, CD8, CXCR5, ICOS, PD-1, CCR6, CXCR3, CD19, CD20, CD27, CD38 (**Tabla 4**), las células se lavaron con PBS1x/2%SFB/0,01%NaN<sub>3</sub>, seguido por un lavado con PBS, resuspendidas en PFA al 1% y fueron analizadas en un citómetro de flujo de cuatro colores FACSCalibur usando el programa CellQuest (BD Biosciences, San José, CA, EEUU).

### 3.2 Tinción intracelular

Para llevar a cabo la detección de citoquinas intracelulares se añadió a los cultivos celulares PMA (10nM), ionomicina (2µM) y monensina (4µM) (todos ellos de Sigma-Aldrich) durante 16 horas con el fin de paralizar el tráfico intracelular y la secreción de citoquinas. Después de su estimulación, las células fueron lavadas con PBS1x/2%SFB/0,01%NaN<sub>3</sub> y fijadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con PFA al 4%. Inmediatamente después las células fueron lavadas con PBS1x/2%SFB/0,01%NaN<sub>3</sub> y a continuación fueron permeabilizadas durante 20 minutos a temperatura ambiente con la solución “FACS permeabilizing solution 2” (BD Pharmingen). Posteriormente, las células fueron lavadas de nuevo con PBS1x/2%SFB/0,01%NaN<sub>3</sub> y se incubaron durante 1 hora, a 4°C y en oscuridad con los diferentes anticuerpos conjugados directamente con fluorocromo: anti-IL-17A, anti-IFNγ, anti-TNFα o anti-IL-10 (**Tabla 6**). Por último, las células fueron lavadas de nuevo con PBS1x/2%SFB/0,01%NaN<sub>3</sub>, seguido por un lavado con PBS, y finalmente resuspendidas en PFA al 1% y analizadas en un citómetro de flujo de cuatro colores FACSCalibur usando el programa CellQuest (BD Biosciences, San José, CA, EEUU).

En el caso de la detección de FoxP3 (del inglés *Forkhead box P3*) las células no fueron estimuladas, pero para poder realizar la tinción intranuclear fue necesaria la permeabilización de la membrana nuclear de las células con un kit especial para FoxP3 llamado “*FoxP3 Staining Buffer Set human*” de Miltenyi Biotec. A continuación, las células fueron incubadas durante 1 hora, a 4°C y en oscuridad con el anticuerpo conjugado directamente con fluorocromo: anti-FoxP3 (**Tabla 6**). Por último, las células fueron lavadas con PBS1x/2%SFB/0,01%NaN<sub>3</sub>, seguido por un lavado con PBS, y finalmente resuspendidas en PFA al 1% y analizadas en un citómetro de flujo de cuatro colores FACSCalibur usando el programa CellQuest (BD Biosciences, San José, CA, EEUU).

Anticuerpo	Fluoróforo	Clon	Casa comercial
<b>CD3</b>	PercP	SK7	BD Pharmingen
	APC	SK7	BD Pharmingen
<b>CD4</b>	PercP-Cy5.5	SK3	BD Pharmingen
<b>CD8</b>	FITC	SK1	BD Pharmingen
<b>CD19</b>	PercP-Cy5.5	SJ25C1	BD Pharmingen
<b>CD20</b>	PE	L27	BD Pharmingen
<b>CD25</b>	Alexa Fluor 488	BC96	eBioscience
<b>CD27</b>	FITC	M-T271	BD Pharmingen
<b>CD38</b>	APC	IB6	Miltenyi Biotech
<b>CD45RA</b>	FITC	L48	BD Pharmingen
<b>CD45RO</b>	FITC	UCHL1	BD Pharmingen
<b>CD127 (7R)</b>	PE	HIL-7R-M21	BD Pharmingen
<b>CD183 (CXCR3)</b>	Alexa Fluor 488	1C6/CXCR3	BD Pharmingen
<b>CD194 (CCR4)</b>	Alexa Fluor 647	1G1	BD Pharmingen
<b>CD196 (CCR6)</b>	PE	11A9	BD Pharmingen
<b>CD278 (ICOS)</b>	PE	ISA-3	eBioscience
<b>CD279 (PD-1)</b>	PercP-Cy5.5	EH12.1	BD Pharmingen
<b>CXCR5</b>	Alexa Fluor 647	RF8B2	BD Pharmingen
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	APC	B27	BD Pharmingen
<b>IL-17A</b>	PE	eBio64DEC17	eBioscience
	Alexa Fluor 647	eBio64DEC17	eBioscience
<b>IL-10</b>	PE	B-T10	Miltenyi Biotech
<b>FoxP3</b>	Alexa Fluor 488	236A/E7	eBioscience
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	FITC	MAb11	BD Pharmingen
<b>IL-23R</b>	biotinilado	-	R&D Systems
<b>Avidina</b>	FITC	Avidin	BD Pharmingen

**Tabla 6. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.** FITC: *Fluorescein Isothiocyanate*, PE: *Phycoerythrin*, PercP: *Peridinin chlorophyll cyanine 5.5*, PercP-Cy5.5: *Peridinin chlorophyll cyanine 5.5*, APC: *Allophycocyanin*.

#### 4. ELISAS (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Para determinar los niveles de secreción de las diferentes citoquinas de interés, fue necesario recoger los sobrenadantes libres de células tras la estimulación durante 16 horas con PMA (10nM) e Ionomicina (2 $\mu$ M) y se mantuvieron a -80°C hasta su utilización. Para determinar la presencia de IL-17A e IL-22 se utilizaron kit de ELISA de eBiosciences, y para IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4 se necesitaron kit de BD Biosciences. En todos ellos se siguieron las instrucciones del fabricante. Los mínimos de detección de los kit fueron los siguientes: 4pg/ml para IL-17A, 8pg/ml para IL-22, 4,7pg/ml para IFN $\gamma$  y 7,8pg/ml para TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4.

Del mismo modo, en el caso de los cocultivos se recogieron los sobrenadantes libres de células a diferentes días de cocultivo y se mantuvieron a -80°C hasta su utilización para la determinación de las concentraciones de Igs. Para ello, las placas de 96 pocillos (MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) se recubrieron toda la noche a 4°C con 10µg/ml de los anticuerpos anti-humano generados en ratón IgG, IgA e IgM (AbD Serotec, Munich, Alemania). A continuación, se bloquearon con PBS que contenía 2% de BSA (del inglés *Bovine Serum Albumin*) (PBS1x/2%BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente, y seguidamente se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente con las curvas patrón de IgG, IgA e IgM humano (Sigma-Aldrich) y con los sobrenadantes de los cocultivos, todos ellos diluidos en PBS1x/2%BSA. Por último, se lavaron y se revelaron con los anticuerpos anti-humano generados en cabra IgG, IgA e IgM conjugados con HRP (del inglés *Horseradish Peroxidase*) (AbD Serotec), seguidos por la solución sustrato TMB (del inglés *Tetramethylbenzidine*) (BD Pharmingen). La absorbancia fue medida a 450nm en un Synergy H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winoosi, VT, EEUU).

## 5. DETERMINACIÓN DE IgG, IgA e IgM EN SUERO

---

Los sueros de todos los sujetos que participaron en el estudio de células Tfh fueron recogidos el mismo día que se realizaron los estudios fenotípicos y se mantuvieron a -80°C hasta su utilización. Las concentraciones de IgG, IgA e IgM fueron examinadas por nefelometría en los sueros de los pacientes con EA/nb, EA/b y de sujetos sanos mediante un “Image 800 Immunochemistry System” (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU). Para los pacientes con EA/b, la determinación de Igs también se realizó en los sueros que se recogieron justo antes del comienzo del tratamiento con bloqueantes del TNF.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

---

La comparación entre grupos se realizó mediante un test *U de Mann-Whitney*. En los casos necesarios se realizó una corrección de Bonferroni para las comparaciones múltiples. Además, las correlaciones fueron analizadas mediante regresión de Spearman y todos los datos fueron analizados utilizando el programa Prisma en su versión 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EEUU).







## **IV. RESULTADOS**

---



## **A. ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS Th17 EN PACIENTES CON ESPONDILOARTRITIS AXIAL NO RADIOLÓGICA DE RECIENTE COMIENZO Y ESPONDILITIS ANQUILOSANTE ESTABLECIDA**

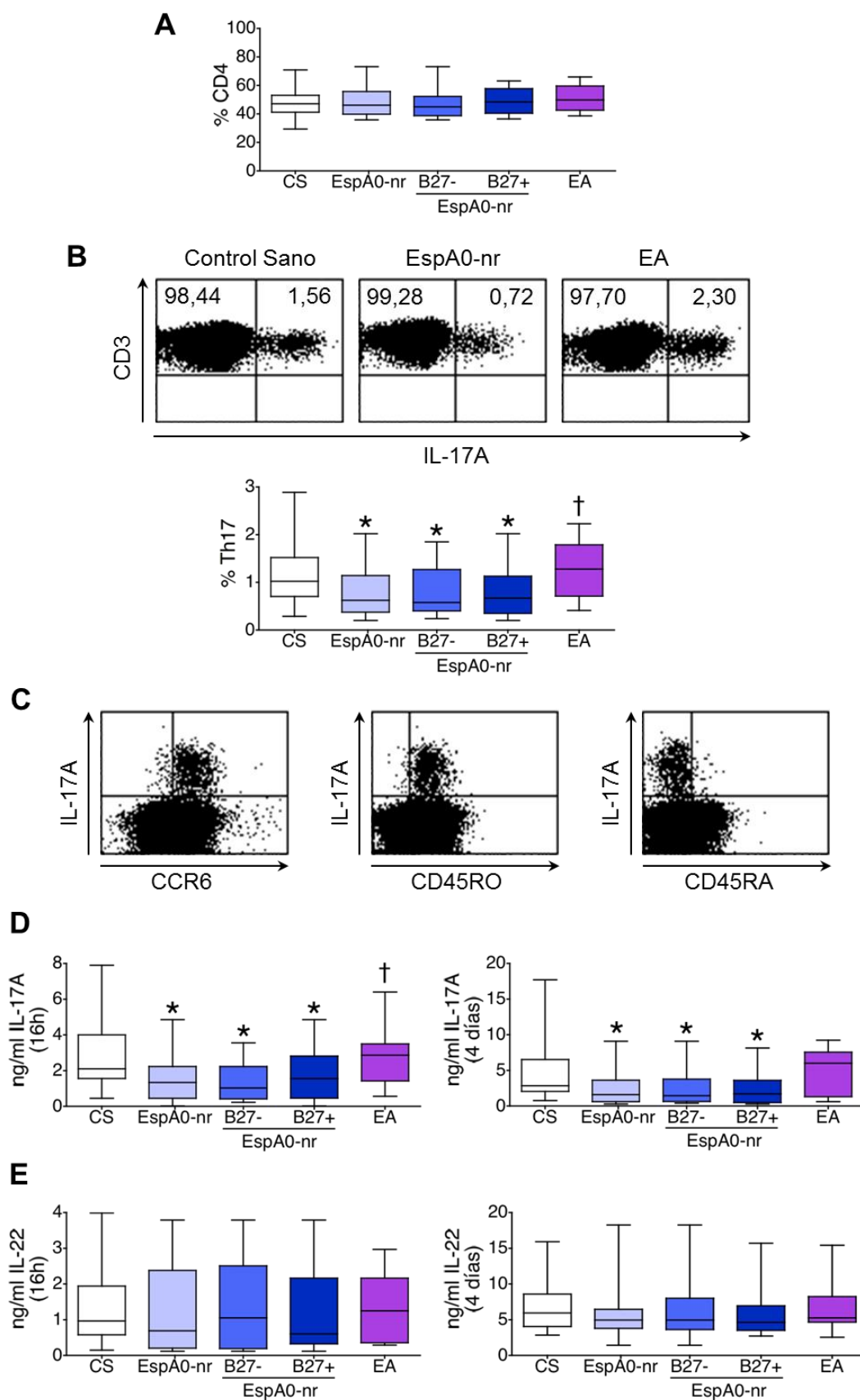
Las EspA son un conjunto de enfermedades inflamatorias en las que se ha observado una alteración de las células Th17, confirmando que dichas células podrían estar implicadas en la patogenia de la enfermedad (Jandus et al., 2008; Romero-Sanchez et al., 2011; Shen et al., 2009a; Singh et al., 2007; Wang et al., 2009b). En base a estas observaciones, quisimos investigar la posible participación de estas células en pacientes con EA y con EspA0-nr para poder dilucidar lo que sucede en estadios iniciales de estas enfermedades.

### **1. EXPRESIÓN DE IL-17 E IL-22 EN CÉLULAS T CD4+ DE PACIENTES CON EspA0-nr Y EA**

---

En primer lugar, estábamos interesados en analizar la expresión de las células Th17 circulantes en nuestros pacientes con EspA0-nr y EA. Para este fin, aislamos células T CD4+ de sangre periférica de todos los sujetos que participaron en el estudio (41 controles sanos, 30 pacientes con EspA0-nr y 11 pacientes con EA). Cabe destacar que no existían diferencias en el porcentaje de células T CD4+ entre los pacientes con EspA0-nr, EA y los controles sanos (**Figura 13A**).

Una vez comprobado que la frecuencia de células T CD4+ fue semejante entre los sujetos de nuestro estudio, quisimos examinar en pacientes con EspA0-nr y EA la frecuencia de células T CD4+ circulantes que expresaban IL-17A, también llamadas células Th17. Para ello realizamos una tinción intracelular de IL-17A en células T CD4+ aisladas tanto de pacientes con EspA0-nr y EA como de controles sanos. Al analizar la frecuencia de células T CD4+ circulantes que expresaban IL-17A encontramos que ésta estaba disminuida significativamente en pacientes con EspA0-nr en comparación con controles sanos (**Figura 13B**). Además, no existían diferencias entre pacientes con EspA0-nr HLA-B27+ y HLA-B27- (**Figura 13B**). Por otro lado, el porcentaje de células Th17 en sangre periférica de pacientes con EA no fue diferente al de los controles sanos confirmando así que las diferencias encontradas eran específicas de los pacientes con EspA0-nr (**Figura 13B**).



**Figura 13. Expresión de IL-17A e IL-22 en células T CD4<sup>+</sup> circulantes de pacientes con EspA0-nr y EA.** (A) Porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> en controles sanos (CS), pacientes con EspA0-nr y EA. (B) Porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> que expresan IL-17A (células Th17) determinado por citometría de flujo después de 16 horas de estimulación con PMA/Ionomicina + Monensina en CS, EspA0-nr y EA. Dado que la

molécula de CD4 disminuye su expresión bajo la estimulación con PMA, en los diagramas de puntos representativos se muestran la expresión de CD3 en células T CD4 aisladas. (C) Diagramas de puntos representativos de citometría de flujo que muestran la expresión de CCR6, CD45RO y CD45RA *vs* IL-17A en células T CD4+ aisladas. (D) Secreción de IL-17A al medio de cultivo de células T CD4+ estimuladas durante 16 horas con PMA/Ionomicina (**gráfico de la izquierda**) o durante 4 días con anti-CD3/CD28/CD49d (**gráfico de la derecha**). (E) Secreción de IL-22 al medio de cultivo de células T CD4+ estimuladas durante 16 horas con PMA/Ionomicina (**gráfico de la izquierda**) o durante 4 días con anti-CD3/CD28/CD49d (**gráfico de la derecha**). Los gráficos de cajas de A, B, D y E representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos a partir de 30 pacientes con EspA0-nr (15 HLA-B27- y 15 HLA-B27+), 11 pacientes con EA y 41 CS. \* $p < 0,05$  *vs* CS, † $p < 0,05$  *vs* EspA0-nr.

Al estudiar el fenotipo de las células Th17 encontramos que todas expresaban el marcador fenotípico de células de memoria CD45RO, eran negativas para el marcador de células vírgenes CD45RA y positivas para la expresión de CCR6 (**Figura 13C**). Por otro lado, intentamos determinar la expresión de otros marcadores fenotípicos de las células Th17 como son el IL-23R y el marcador CCR4, pero no pudimos analizarlos junto a la expresión de IL-17A ya que estas dos moléculas disminuyen su expresión bajo la estimulación con PMA/Ionomicina.

Una vez estudiada la frecuencia de las células Th17, quisimos determinar mediante ELISA la concentración de IL-17A en los sobrenadantes de los cultivos de células T CD4+ estimuladas con PMA/Ionomicina, de todos los sujetos de nuestro estudio. Como puede observarse en la **Figura 13D**, la concentración de IL-17A estaba disminuida significativamente en los pacientes con EspA0-nr en comparación con los controles sanos. Además, esta disminución no solo se detectaba en células estimuladas 16 horas con PMA/Ionomicina, sino que también se observaba después de la estimulación durante 4 días con anti-CD3/CD28/CD49d (**Figura 13D**). Cabe destacar que la secreción de IL-17A por células T CD4+ no fue diferente entre los pacientes con EspA0-nr HLA-B27+ y HLA-B27-. Asimismo, la cantidad de IL-17A secretada por células T CD4+ en pacientes con EA no fue diferente a la detectada en los controles sanos (**Figura 13D**).

Teniendo en cuenta que varios estudios han descrito la producción de IL-17 por otras poblaciones celulares (Appel et al., 2011a; Cua and Tato, 2010; Ito et al., 2009; Noordenbos et al., 2012), analizamos la expresión de esta citoquina por citometría de flujo en las poblaciones de CD8,  $\gamma/\delta$ , y NK en PBMCs totales de pacientes con EspA0-nr, EA y controles sanos. Además, analizamos la producción de esta citoquina en los sobrenadantes de cultivos de PBMCs después de una meticulosa depleción de células T CD4+. Al hacerlo, no pudimos detectar IL-17A en dichos sobrenadantes después de la estimulación a

corto o largo plazo, de acuerdo con el trabajo publicado por Shen y col. (Shen et al., 2009a).

Por último, como previamente se había descrito que la IL-22 es una citoquina secretada por células Th17 (Lubberts, 2010), decidimos analizar la secreción de esta citoquina en los sobrenadantes de los cultivos de células T CD4+ estimuladas a corto y largo plazo de todos nuestros sujetos. Como se observa en la **Figura 13E**, no existían diferencias en la secreción de IL-22 entre EspA0-nr, EA y controles sanos después de la estimulación durante 16 horas con PMA/Ionomicina ni después de 4 días de estimulación con anti-CD3/CD28/CD49d.

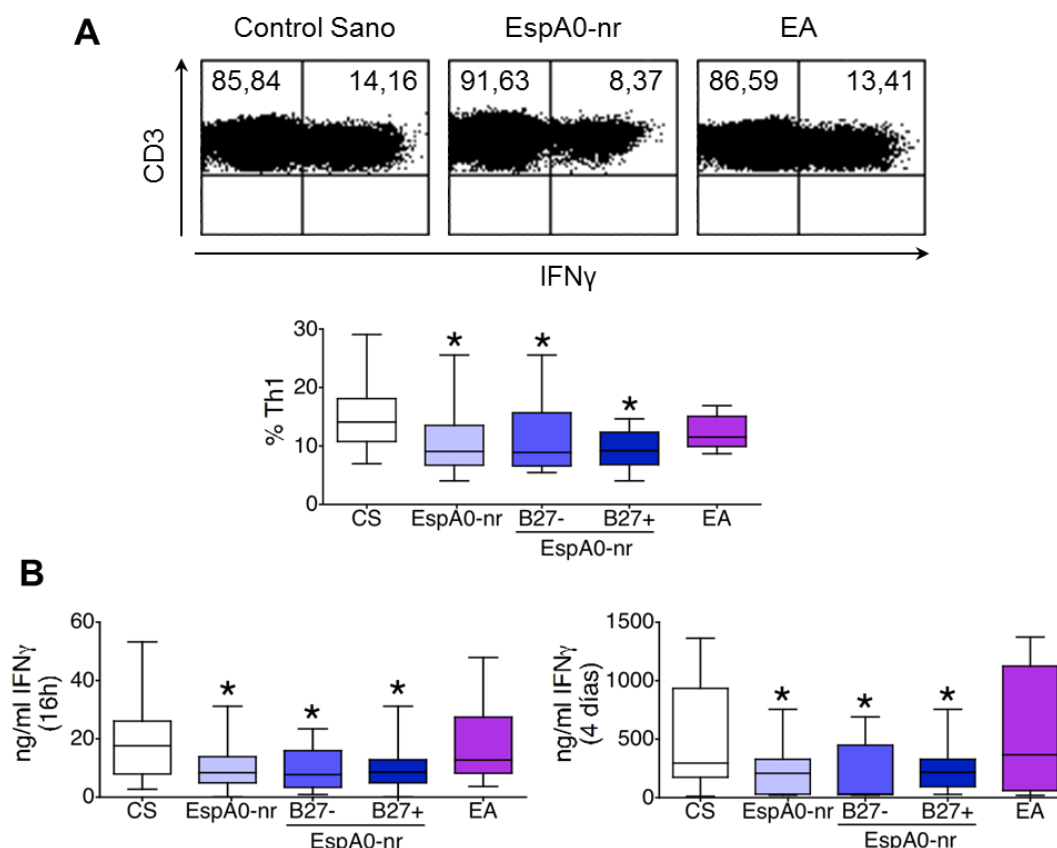
## **2. EXPRESIÓN DE IFN- $\gamma$ EN CÉLULAS T CD4+ DE PACIENTES CON EspA0-nr Y EA**

---

Una vez estudiada la expresión de las células Th17 en nuestros pacientes, quisimos analizar la expresión de la subpoblación de células T CD4+ circulantes capaces de producir IFN $\gamma$ , también llamadas células Th1 (Mosmann et al., 1986). Al examinar la frecuencia de estas células encontramos que los pacientes con EspA0-nr presentaban una disminución significativa en comparación con los controles sanos, sin existir diferencias entre los pacientes que presentaban HLA-B27+ y HLA-B27- (**Figura 14A**). Por el contrario, el porcentaje de células Th1 en sangre periférica de pacientes con EA no fue diferente al encontrado en los controles sanos (**Figura 14A**).

Asimismo, la concentración de IFN $\gamma$  detectada por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de células T CD4+ estimuladas a corto plazo (16 horas) en los pacientes con EspA0-nr se encontraba significativamente disminuida en comparación con los controles sanos (**Figura 14B**). Este hecho no solo ocurría cuando las células se estimulaban a corto plazo con PMA/Ionomicina, sino también después de la estimulación durante 4 días con anti-CD3/CD28/CD49d, sin existir diferencias entre los pacientes que presentaban HLA-B27+ y HLA-B27- (**Figura 14B**). Por el contrario, la cantidad de IFN $\gamma$  secretada por células T CD4+ en pacientes con EA no fue diferente a la encontrada en los controles sanos (**Figura 14B**).

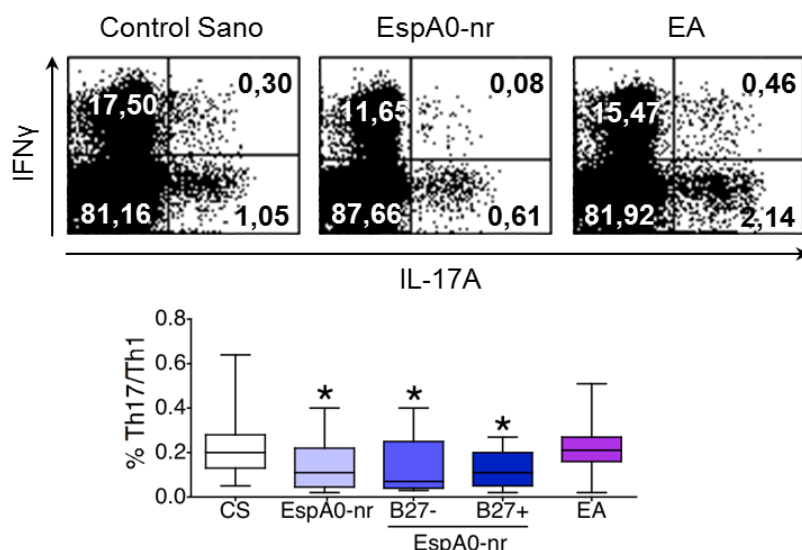




**Figura 14. Expresión de IFN $\gamma$  en células T CD4 $^{+}$  circulantes de pacientes con EspA0-nr y EA.** (A) Porcentaje de células T CD4 $^{+}$  que expresan IFN $\gamma$  (células Th1) determinado por citometría de flujo después de 16 horas de estimulación con PMA/Ionomicina + Monensina en controles sanos (CS), pacientes con EspA0-nr y EA. Dado que la molécula de CD4 disminuye su expresión bajo la estimulación con PMA, en los diagramas de puntos representativos se muestran la expresión de CD3 en células T CD4 aisladas. (B) Secreción de IFN $\gamma$  al medio de cultivo en células T CD4 $^{+}$  estimuladas durante 16 horas con PMA/Ionomicina (**gráfico de la izquierda**) o después de 4 días con anti-CD3/CD28/CD49d (**gráfico de la derecha**). Los gráficos de cajas de A y B representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos a partir de 30 pacientes con EspA0-nr (15 HLA-B27- y 15 HLA-B27+), 11 pacientes con EA y 41 CS. \* $p < 0,05$  vs CS.

### 3. FRECUENCIA DE CÉLULAS Th17/Th1 EN PACIENTES CON EspA0-nr Y EA

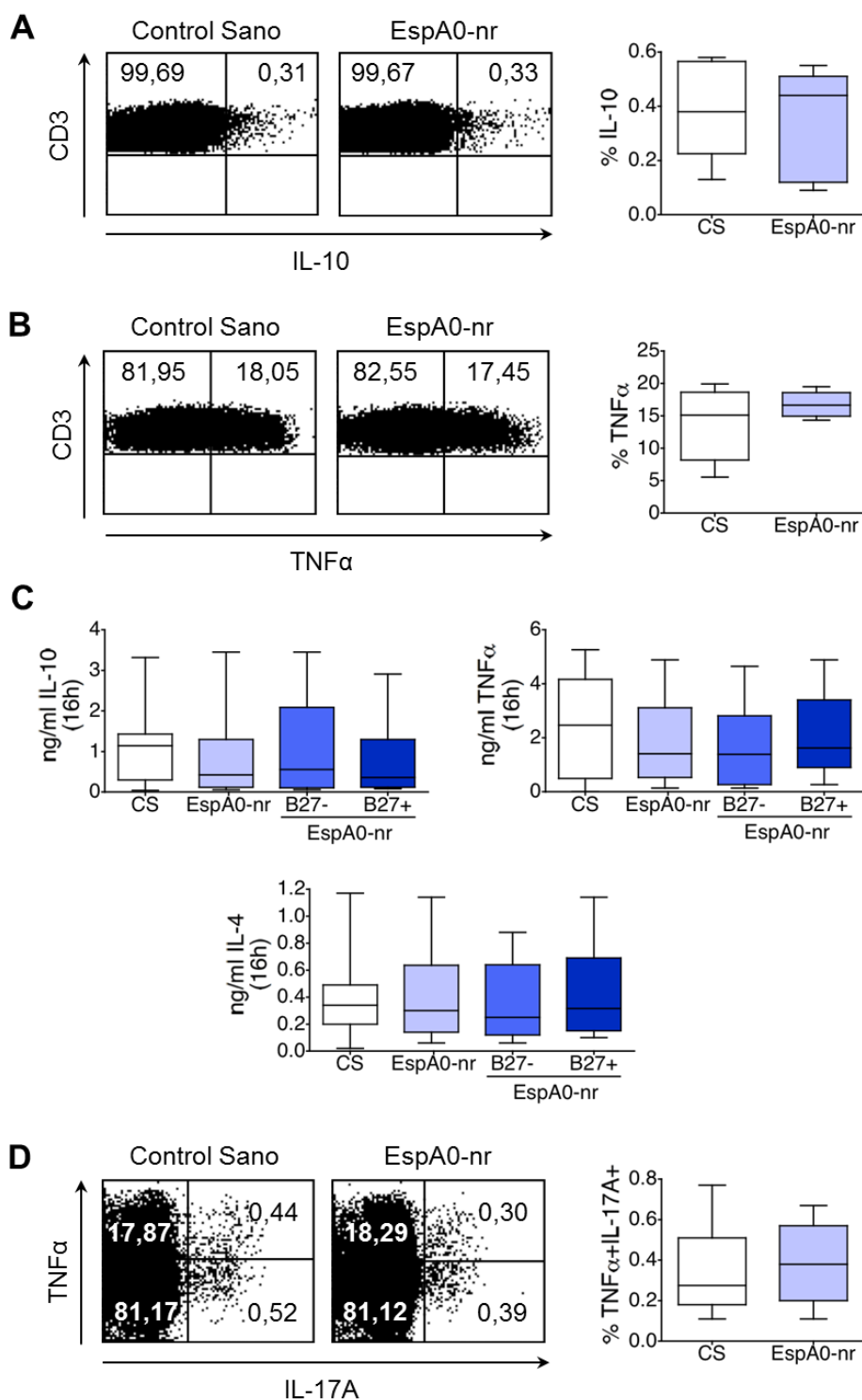
Previamente, algunos autores habían descrito la existencia de una población de células que eran capaces de producir IL-17 e IFN $\gamma$  simultáneamente, llamadas células Th17/Th1 (Annunziato et al., 2007). Por esta razón, quisimos estudiar la frecuencia de esta población en nuestros pacientes. Cuando analizamos la sangre periférica de los sujetos de nuestro estudio detectamos células Th17/Th1, y dicha frecuencia estaba disminuida significativamente en los pacientes con EspA0-nr, tanto en sujetos HLA-B27+ como HLA-B27-, en comparación con los controles sanos (**Figura 15**). Por el contrario, el porcentaje de células Th17/Th1 en sangre periférica de pacientes con EA no fue diferente al encontrado en los controles sanos (**Figura 15**).



**Figura 15. Frecuencia de células Th17/Th1 en células T CD4+ circulantes de pacientes con EspA0-nr y EA.** Porcentaje de células T CD4+ que expresan tanto IL-17A como IFN $\gamma$  (células Th17/Th1) determinado por citometría de flujo después de 16 horas de estimulación con PMA/Ionomicina + Monensina en controles sanos (CS), pacientes con EspA0-nr y EA. Los gráficos de cajas representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos a partir de 30 pacientes con EspA0-nr (15 HLA-B27- y 15 HLA-B27+), 11 pacientes con EA y 41 CS. \* $p < 0,05$  vs CS.

#### 4. EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ , IL-10 E IL-4 EN CÉLULAS T CD4+ DE PACIENTES CON EspA0-nr

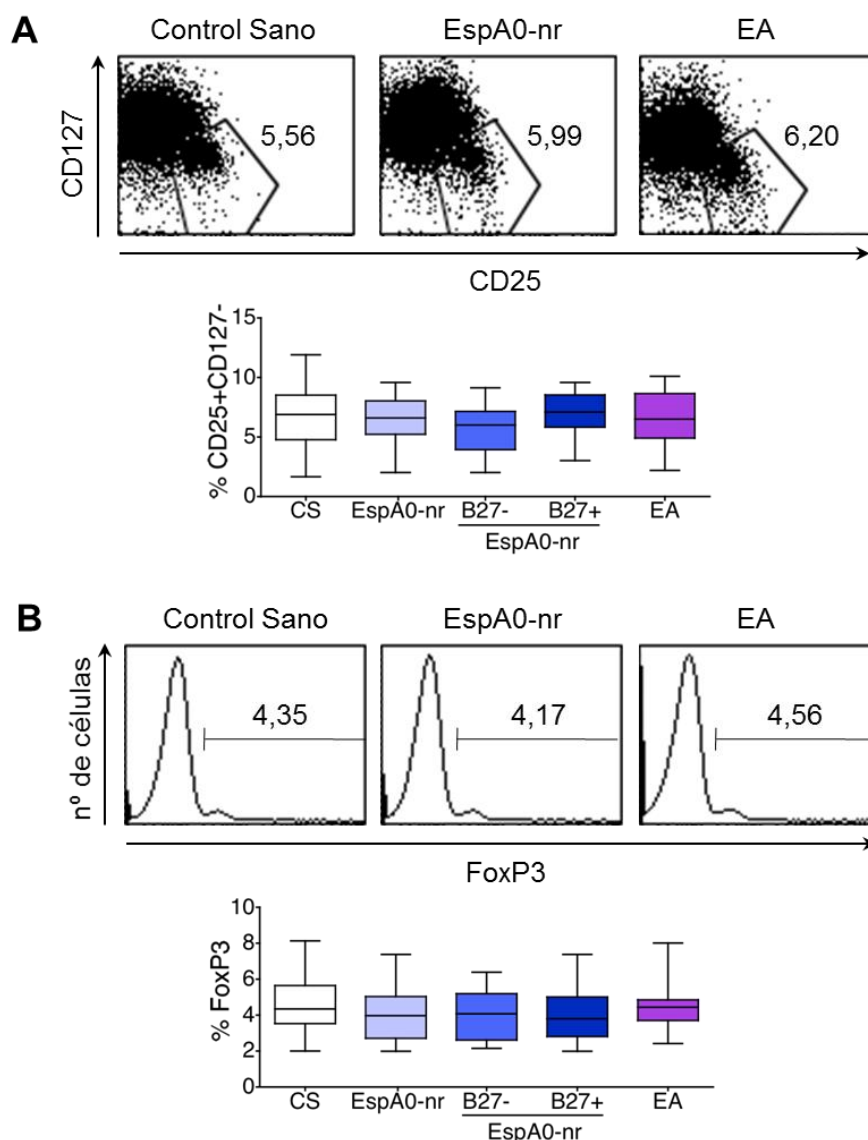
Al comprobar que los pacientes con EspA0-nr presentaban una disminución de células Th17 y células Th1, quisimos determinar si éstos se caracterizaban por un defecto generalizado en la producción de citoquinas. Para poder dilucidar este hecho, analizamos la expresión de otras citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4) en nuestros pacientes con EspA0-nr. Al hacerlo, detectamos que la frecuencia de células T CD4+ circulantes productoras de IL-10 o de TNF- $\alpha$  (**Figura 16A-B**), junto con la concentración de IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-4 en los sobrenadantes de células T CD4+ estimuladas durante 16 horas con PMA/Ionomicina (**Figura 16C**) fue comparable entre los pacientes con EspA0-nr y los controles sanos, sin existir diferencias entre los pacientes HLA-B27- y HLA-B27+. Además, la frecuencia de células T CD4+ circulantes que coexpresaban IL-17A y TNF- $\alpha$  no fue diferente entre los pacientes con EspA0-nr y los controles sanos (**Figura 16D**).



**Figura 16. Expresión de IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-4 en células T CD4+ circulantes de pacientes con EspA0-nr.** (A, B) Porcentaje de células T CD4+ que expresan IL-10 o TNF- $\alpha$  después de 16 horas de estimulación con PMA/Ionomicina + Monensina en controles sanos (CS) y pacientes con EspA0-nr. Dado que la molécula de CD4 disminuye su expresión bajo la estimulación con PMA, en los diagramas de puntos representativos se muestran la expresión de CD3 en células T CD4 aisladas. (C) Secreción de IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-4 al medio de cultivo en células T CD4+ estimuladas durante 16 horas con PMA/Ionomicina. (D) Frecuencia de células T CD4+ que expresan tanto IL-17A como TNF- $\alpha$  después de 16 horas de estimulación con PMA/Ionomicina + Monensina. Los gráficos de cajas de A-D representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos a partir de 8 pacientes con EspA0-nr y 8 CS (A, B y D) ó 30 pacientes con EspA0-nr y 30 CS (C).

## 5. FRECUENCIA DE CÉLULAS T CD4+CD25+CD127- Y DE CÉLULAS T CD4+FoxP3+ CIRCULANTES EN PACIENTES CON EspA0-nr Y EA

Recientemente, algunos autores han indicado que existe una estrecha relación entre células Th17 y células T reguladoras CD4+CD25+ (Lubberts, 2010). Por este motivo, decidimos examinar la frecuencia de esta subpoblación de células T CD4+ en nuestros pacientes. Al hacerlo encontramos que las frecuencias tanto de células T CD4+CD25+CD127- como de células T CD4+FoxP3+ no fueron diferentes entre pacientes con EspA0-nr, pacientes con EA y controles sanos (**Figura 17A-B**).



**Figura 17. Frecuencia de células T CD4+CD25+CD127- y CD4+FoxP3+ circulantes en pacientes con EspA0-nr y EA.** (A) Porcentaje de células T CD25+CD127- dentro de células T CD4+ circulantes de controles sanos (CS), pacientes con EspA0-nr y EA. (B) Porcentaje de células T CD4+ circulantes que expresan FoxP3 en CS, EspA0-nr y EA. Los gráficos de cajas de A y B representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos calculados a partir de 30 pacientes con EspA0-nr (15 HLA-B27- y 15 HLA-B27+), 11 pacientes con EA y 41 CS.

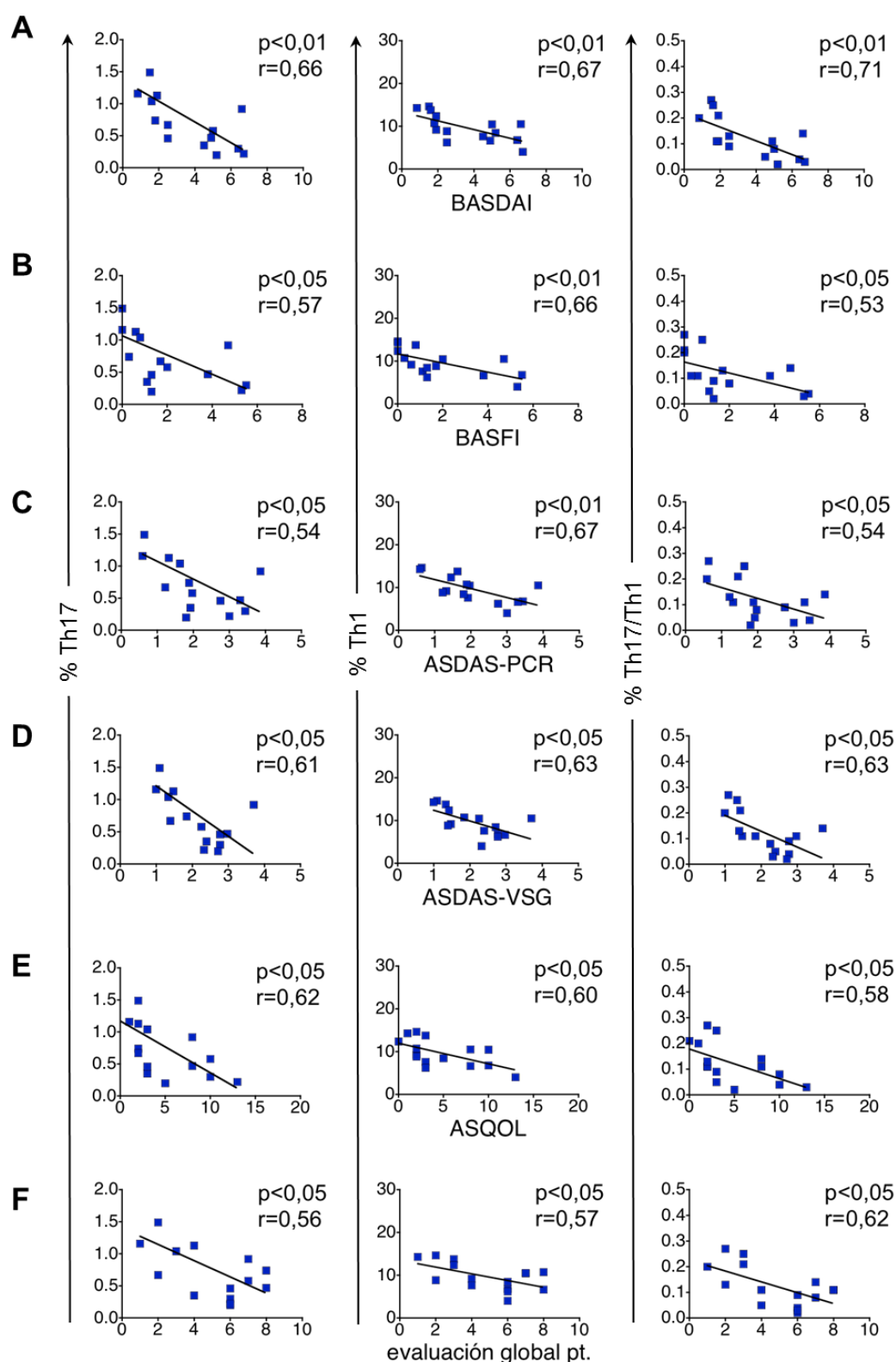
## 6. RELACIÓN ENTRE LAS CÉLULAS Th17, Th1 Y Th17/Th1 CIRCULANTES Y LOS PARÁMETROS CLÍNICOS EN PACIENTES CON EspA0-nr Y EA

---

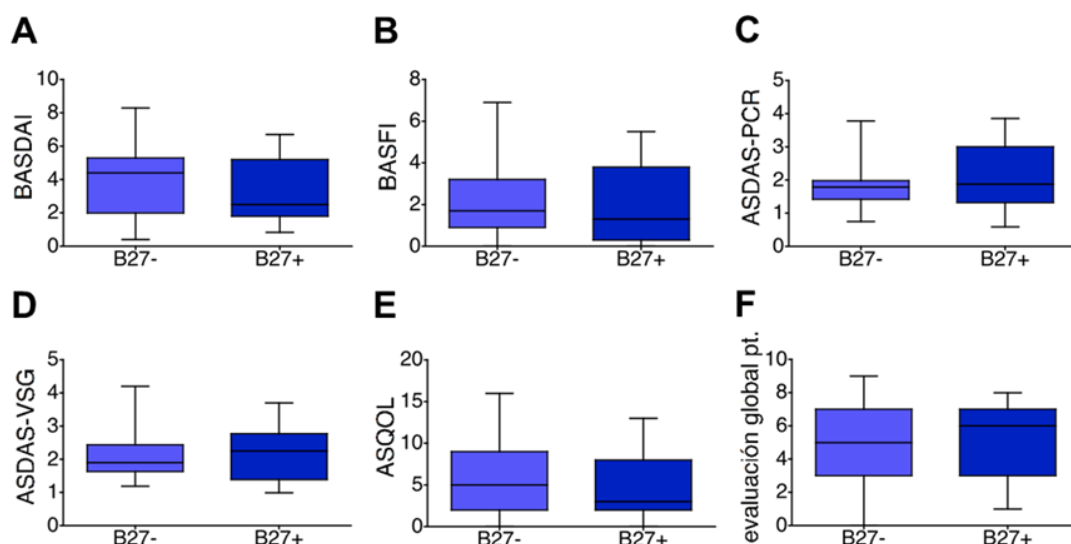
Finalmente, decidimos analizar si existía alguna relación entre las frecuencias circulantes de células Th17, Th1 y Th17/Th1 y los datos clínicos y analíticos. Al hacerlo, encontramos que en pacientes con EspA0-nr HLA-B27+ los porcentajes de células Th17, Th1 y Th17/Th1 en sangre periférica se correlacionaban negativamente con los siguientes parámetros: BASDAI, BASFI, ASDAS-PCR, ASDAS-VSG, ASQOL y evaluación global del paciente (**Figura 18A-F**). Por el contrario, estos parámetros no se correlacionaron con las frecuencias de células Th17, Th1 y Th17/Th1 en pacientes con EspA0-nr HLA-B27-, a pesar de que dichas frecuencias no fueron diferentes entre pacientes con HLA-B27+ y HLA-B27- (**Figuras 13-15**). Asimismo, cabe destacar que no se observaban diferencias en cuanto a los parámetros clínicos de BASDAI, BASFI, ASDAS-PCR, ASDAS-VSG, ASQOL o evaluación global del paciente entre los pacientes HLA-B27+ y HLA-B27- (**Figura 19A-F**).

Por último, y de manera inesperada, en pacientes con EA se observó correlación entre el porcentaje de células Th17 circulantes y el índice de BASDAI, pero esta correlación era positiva al contrario que la observada en pacientes con EspA0-nr (**Figura 20**). Del mismo modo, encontramos una buena correlación entre el porcentaje de células Th1 circulantes y el índice de BASDAI en pacientes con EA, aunque no llegaba a alcanzar estadística significativa ( $p=0,08$ ) (**Figura 20**). En cuanto al resto de parámetros clínicos (BASFI, ASDAS-PCR, ASDAS-VSG, ASQOL o evaluación global del paciente) no encontramos correlación con los porcentajes de células circulantes en pacientes con EA.

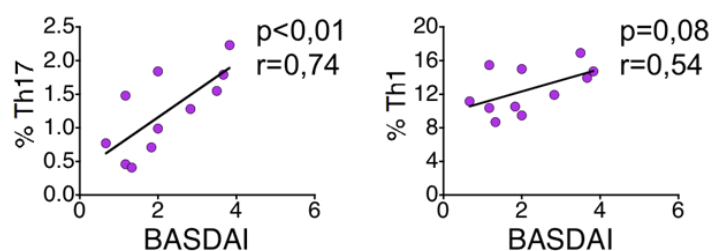
## EspA0-nr HLA-B27+



**Figura 18. Relación de las frecuencias de células Th17, Th1 y Th17/Th1 de sangre periférica con los parámetros clínicos en pacientes con EspA0-nr HLA-B27+.** Los gráficos de la columna de la izquierda, central y derecha muestran las correlaciones de las frecuencias de células Th17, Th1 y Th17/Th1, respectivamente, con el índice de BASDAI (A), índice de BASFI (B), ASDAS-PCR (C), ASDAS-VSG (D), ASQOL (E) y evaluación global del paciente (F) en pacientes con EspA0-nr HLA-B27+ ( $n=15$ ). Cada cuadrado representa un paciente.



**Figura 19. Parámetros clínicos en pacientes con EspA0-nr HLA-B27- vs HLA-B27+.** Comparación del índice de BASDAI (A), índice de BASFI (B), ASDAS-PCR (C), ASDAS-VSG (D), ASQOL (E) y evaluación global del paciente (F) entre pacientes con EspA0-nr HLA-B27- (n=15) y HLA-B27+ (n=15). Los gráficos de cajas de A-F representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos.



**Figura 20. Relación de las frecuencias de células Th17 y Th1 de sangre periférica con el índice de BASDAI en pacientes con EA.** Cada círculo representa un paciente con EA (n=11).

## **B. ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS T<sub>fh</sub> EN PACIENTES CON ESPONDILITS ANQUILOSANTE ESTABLECIDA**

Puesto que algunos autores han observado un aumento de linfocitos B CD5+ en EspA (Cantaert et al., 2012) y otros investigadores han detectado autoanticuerpos en pacientes con EspA (Baerlecken et al., 2014; Baraliakos et al., 2014; Chou et al., 2010; Duftner et al., 2006; Georgopoulos et al., 1985; Wang et al., 2011; Wright et al., 2012), quisimos investigar la posible participación en estas enfermedades de otras células del sistema inmune como son las células T<sub>fh</sub> cuya función es ayudar a la diferenciación y maduración de los linfocitos B a células plasmáticas (Breitfeld et al., 2000; Craft, 2012; Fazilleau et al., 2009; Kim et al., 2001; King et al., 2008; Schaerli et al., 2000). Para ello, nos centramos en el estudio de las células T<sub>fh</sub> y de los plasmablastos circulantes en pacientes con EA establecida puesto que es el prototipo del grupo de las EspA.

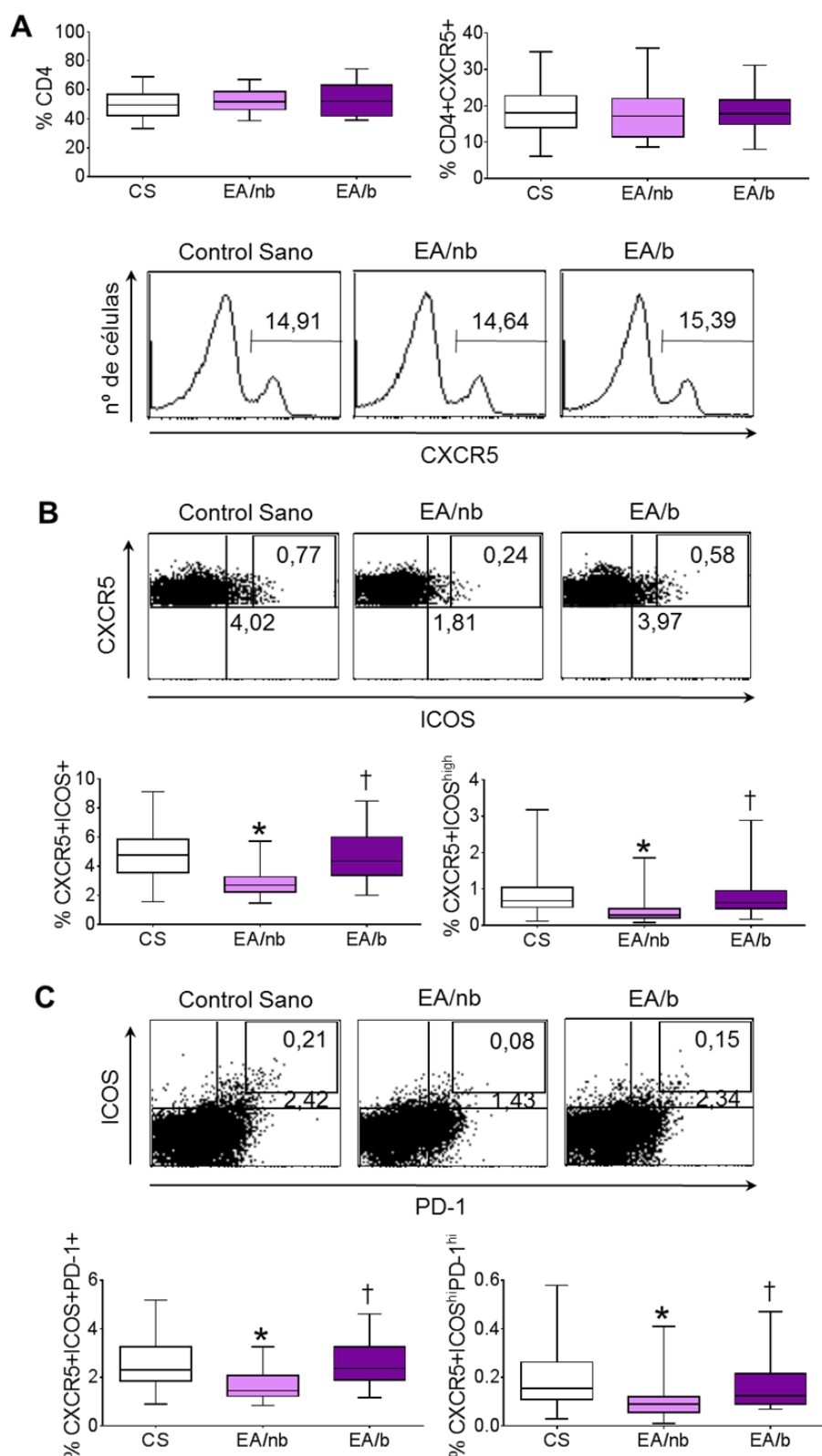
### **1. EXPRESIÓN DE LOS HOMÓLOGOS CIRCULANTES DE LAS CÉLULAS T<sub>fh</sub> CLÁSICAS EN PACIENTES CON EA**

---

En primer lugar, y una vez que habíamos comprobado que la frecuencia de células T CD4+ era semejante entre los pacientes con EA y los controles sanos (**Figura 21A**), quisimos examinar la expresión de marcadores de superficie fenotípicos de células T<sub>fh</sub> dentro de las células T CD4+ de sangre periférica. Al hacerlo, encontramos que la frecuencia de células que eran CXCR5+ dentro de los linfocitos T CD4+ circulantes no era diferente entre los pacientes con EA y los controles sanos (**Figura 21A**). Sin embargo, las frecuencias totales de células T circulantes CD4+CXCR5+ICOS+ y de CD4+CXCR5+ICOS<sup>high</sup>, junto con las frecuencias totales de células T circulantes CD4+CXCR5+ICOS+PD-1+ y de CD4+CXCR5+ICOS<sup>high</sup>PD-1<sup>high</sup>, que recientemente han sido consideradas como homólogos circulantes de las células T<sub>fh</sub> clásicas (también llamadas T<sub>fh</sub> circulantes o cT<sub>fh</sub>) (Chevalier et al., 2011; Simpson et al., 2010; Szabo et al., 2013), se hallaban disminuidas significativamente en los pacientes con EA/nb con respecto a los controles sanos (**Figura 21B-C**). En cambio, no existían diferencias entre los pacientes con EA/b y los controles sanos (**Figura 21B-C**). En paralelo, analizamos los números absolutos de células cT<sub>fh</sub> ya que es importante que dichos valores también se encuentren alterados como reflejo de lo que pasa con el recuento total de células. Al



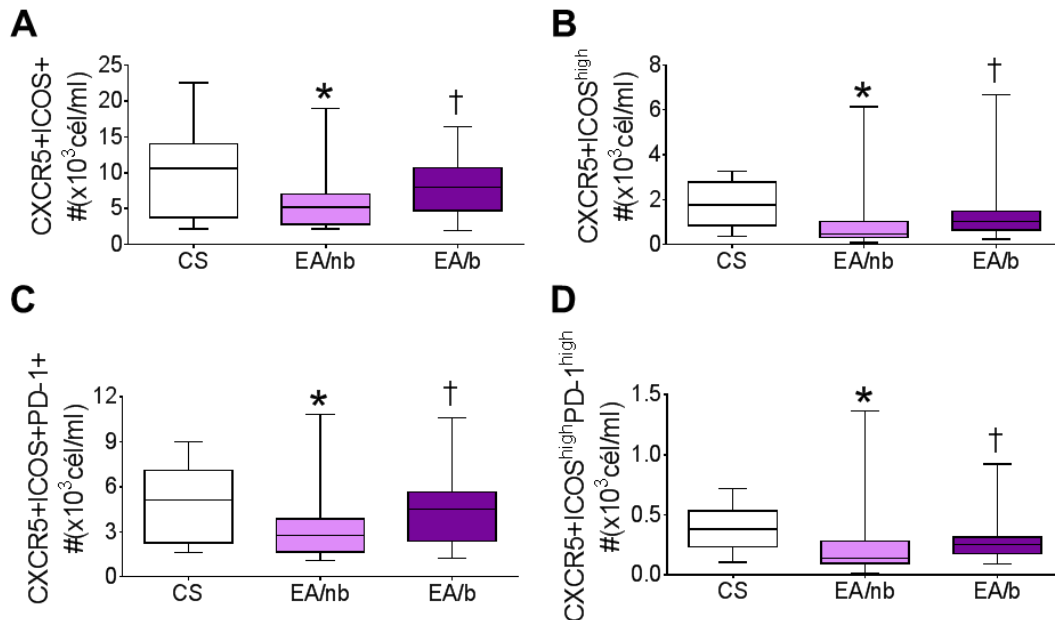
hacerlo, encontramos que el número absoluto de cTfh estaba disminuido en los pacientes con EA/nb (**Figura 22A-D**).



**Figura 21. Frecuencia de los homólogos circulares de células Tfh (cTfh) en pacientes con EA.** (A) Porcentaje de células T CD4+ (gráfico de cajas de la izquierda) y porcentaje e histograma de células T CD4+CXCR5+ (gráfico de cajas de la derecha e histograma) en Controles Sanos (CS), pacientes con

## Resultados

EA/nb y EA/b. **(B)** Porcentaje de células cTfh CD4+CXCR5+ICOS<sup>high</sup> y CD4+CXCR5+ICOS<sup>high</sup> en CS, EA/nb y EA/b. **(C)** Porcentaje de células cTfh CD4+CXCR5+ICOS+PD-1<sup>high</sup> y CD4+CXCR5+ICOS<sup>high</sup>PD-1<sup>high</sup> en CS, EA/nb y EA/b. Los diagramas de puntos representativos muestran la expresión de ICOS y CXCR5 **(B)** o la expresión de ICOS y PD-1 **(C)** en células seleccionadas para CD4 y CXCR5. Los gráficos de cajas de **A-C** representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos calculados a partir de 25 pacientes con EA/nb, 25 pacientes con EA/b y 50 CS. \* $p < 0,0001$  vs CS, † $p < 0,01$  vs pacientes con EA/nb.

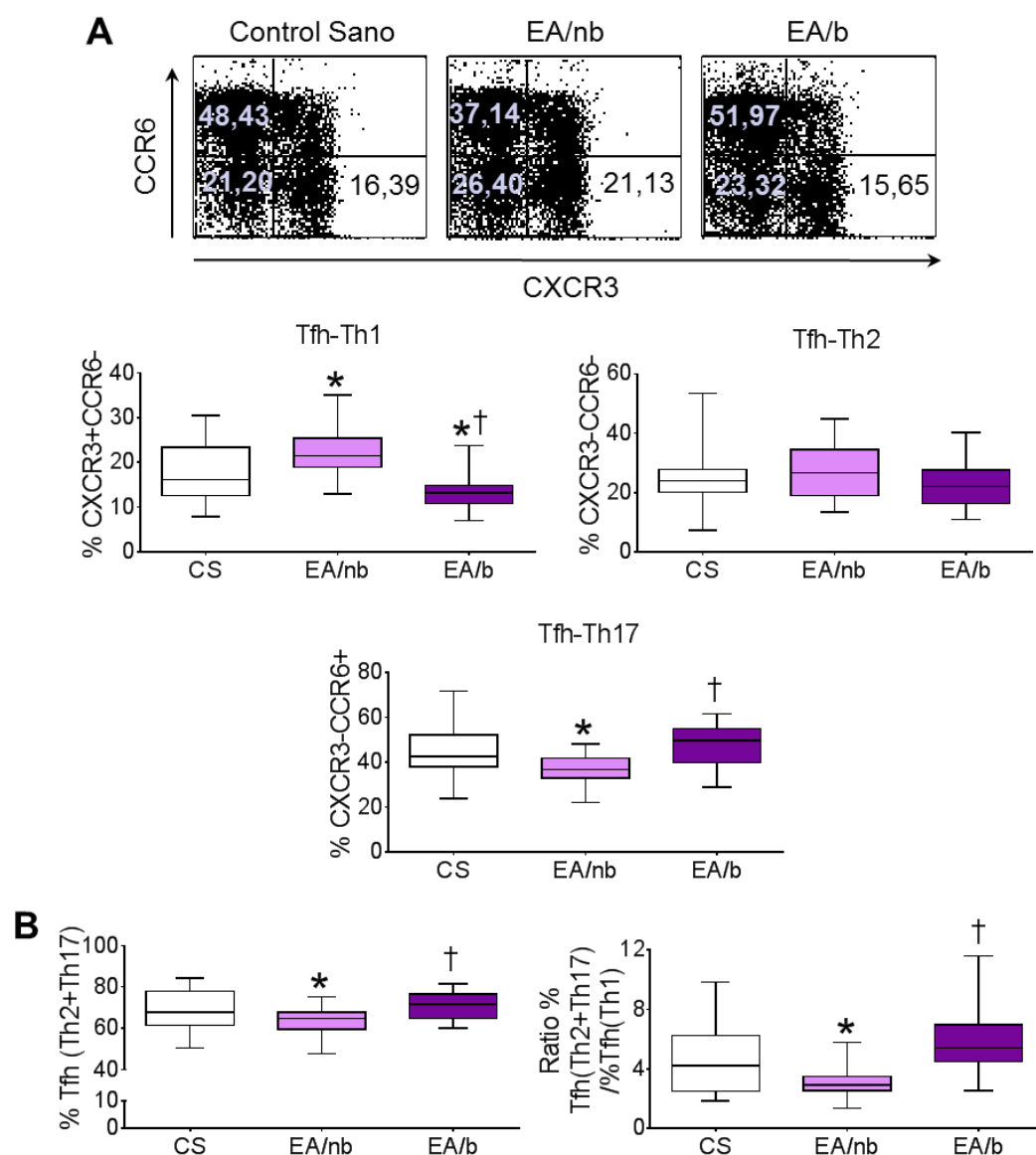


**Figura 22. Números de los homólogos circulantes de células Tfh (cTfh) en pacientes con EA. (A-D)** Números absolutos de los homólogos circulantes de células Tfh (cTfh) en Controles Sanos (CS), EA/nb y EA/b. Los gráficos de cajas representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos calculados a partir de 25 pacientes con EA/nb, 25 pacientes con EA/b y 50 CS. \* $p < 0,05$  vs CS, † $p < 0,05$  vs pacientes con EA/nb.

## 2. FRECUENCIA DE LAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS cTfh EN PACIENTES CON EA

Una vez estudiada la frecuencia en sangre periférica de las células cTfh en pacientes con EA, decidimos examinar la frecuencia de las subpoblaciones de células cTfh descritas por Morita y col. (Morita et al., 2011). Para ello, nos basamos en la expresión combinada de CXCR5 con CCR6 y/o CXCR3 en células T CD4<sup>+</sup>, ya que estos marcadores son característicos receptores de quimioquinas que se expresan en células Th17 o Th1, respectivamente. Al analizar estos marcadores en sangre periférica de nuestros pacientes detectamos que los pacientes con EA/nb mostraban un aumento en la frecuencia de células T CD4+CXCR5+CXCR3+CCR6<sup>-</sup> (Tfh-Th1), junto con una disminución de la frecuencia de células T CD4+CXCR5+CXCR3-CCR6<sup>+</sup> (Tfh-Th17), mientras que la frecuencia de células T CD4+CXCR5+CXCR3-CCR6<sup>-</sup> (Tfh-Th2) no fue diferente a la encontrada en los controles sanos (**Figura 23A**). Además, la suma del porcentaje de células Tfh-Th2 más el

porcentaje de Tfh-Th17, junto con la ratio determinada como  $(\%Tfh-Th2 + \%Tfh/Th17) / \%Tfh-Th1$ , estaban disminuidas en los pacientes con EA/nb con respecto a los controles sanos (**Figura 23B**). Estos hallazgos sugerían que los pacientes con EA/nb, pero no los pacientes con EA/b mostraban un déficit relativo de las subpoblaciones de células cTfh que tenían un fenotipo asociado con la capacidad de ayudar a las células B (Morita et al., 2011).



**Figura 23. Frecuencia de las subpoblaciones de células Tfh circulantes (cTfh) en pacientes con EA. (A)** Frecuencia de las subpoblaciones de células T CD4+CXCR5+CXCR3+CCR6- (Tfh-Th1), CD4+CXCR5+CXCR3-CCR6- (Tfh-Th2) y CD4+CXCR5+CXCR3-CCR6+ (Tfh-Th17) en Controles Sanos (CS), pacientes con EA/nb y EA/b. Los diagramas de puntos representativos muestran la expresión de CXCR3 y CCR6 en células seleccionadas para CD4 y CXCR5. **(B)** Frecuencia de las subpoblaciones de cTfh con fenotipo ayudador de células B (células Tfh-Th2 + Tfh-Th17) y ratio de las subpoblaciones de cTfh en CS, EA/nb y EA/b. Los gráficos de cajas de **A** y **B** representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos calculados a partir de 25 pacientes con EA/nb, 25 pacientes con EA/b y 50 CS. \* $p < 0,05$  vs CS, † $p < 0,005$  vs pacientes con EA/nb.

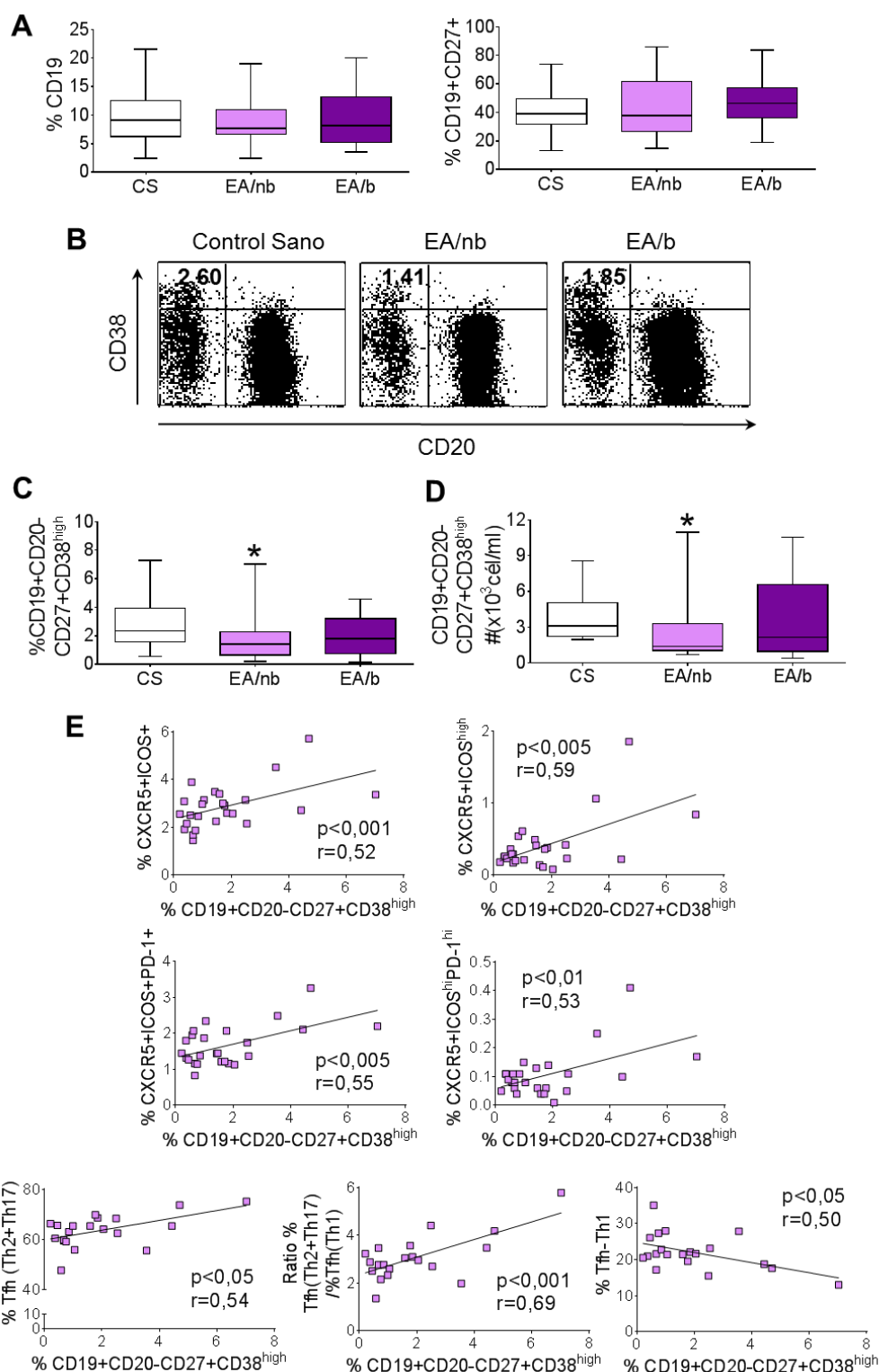
### 3. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE PLASMABLASTOS CIRCULANTES EN PACIENTES CON EA

---

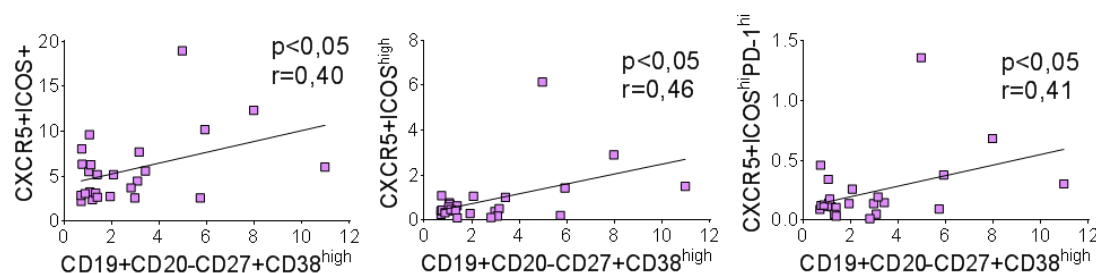
Una vez estudiada la frecuencia de células cTfh quisimos analizar en nuestros pacientes con EA la frecuencia de plasmablastos circulantes dentro de las células CD19+, definidos como células B CD19+CD20-CD27+CD38<sup>high</sup>. Para ello en primer lugar confirmamos que las frecuencias de células CD19+ y CD19+CD27+ eran semejantes entre nuestros pacientes con EA y los controles sanos (**Figura 24A**). A continuación, analizamos la frecuencia de plasmablastos circulantes y encontramos que estaba disminuida en pacientes con EA/nb, pero no en EA/b, con respecto a los controles sanos (**Figura 24B-C**). Del mismo modo, encontramos que el número absoluto de plasmablastos circulantes también estaba disminuido en pacientes con EA/nb (**Figura 24D**).

Por otro lado, observamos que en pacientes con EA/nb la frecuencia de plasmablastos circulantes se correlacionaba positivamente no solo con la frecuencia de las subpoblaciones de cTfh, sino también con la suma de %Tfh-Th2+%Tfh-Th17 y con la ratio (%Tfh-Th2+%Tfh/Th17)/%Tfh-Th1 (**Figura 24E**). Por el contrario, la frecuencia de plasmablastos circulantes se correlacionaba negativamente con la frecuencia de células Tfh-Th1 en pacientes con EA/nb (**Figura 24E**).

Por último, el número absoluto de plasmablastos circulantes se correlacionaba positivamente con el número absoluto de células T CD4+CXCR5+ICOS+, CD4+CXCR5+ICOS<sup>high</sup> y CD4+CXCR5+ICOS<sup>high</sup>PD-1<sup>high</sup> en pacientes con EA/nb (**Figura 25**).



**Figura 24. Números de plasmablastos circulantes en pacientes con EA.** (A) Frecuencia de células CD19+ y CD19+CD27+ en Controles Sanos (CS), pacientes con EA/nb y EA/b. (B, C) Frecuencias de plasmablastos circulantes en CS, EA/nb y EA/b. Los diagramas de puntos representativos muestran la expresión de CD20 y CD38 en células seleccionadas para CD19+ y CD27+ (B). (D) Números absolutos de plasmablastos circulantes en CS, EA/nb y EA/b. Los gráficos de cajas de A, C y D representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos calculados a partir de 25 pacientes con EA/nb, 25 pacientes con EA/b y 50 CS. \*p<0,005 vs CS. (E) Relación de la frecuencia de plasmablastos circulantes con las frecuencias de cTfh, las frecuencias de Tfh(Th2+Th17), la ratio de las subpoblaciones de cTfh y la frecuencia de Tfh-Th1. Cada cuadrado representa un paciente con EA/nb.



**Figura 25. Relación entre el número absoluto de plasmablastos circulantes y el número absoluto de cTfh en pacientes con EA/nb.** Cada cuadrado representa un paciente (n=25).

#### 4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS T CD4+CXCR5+ CIRCULANTES

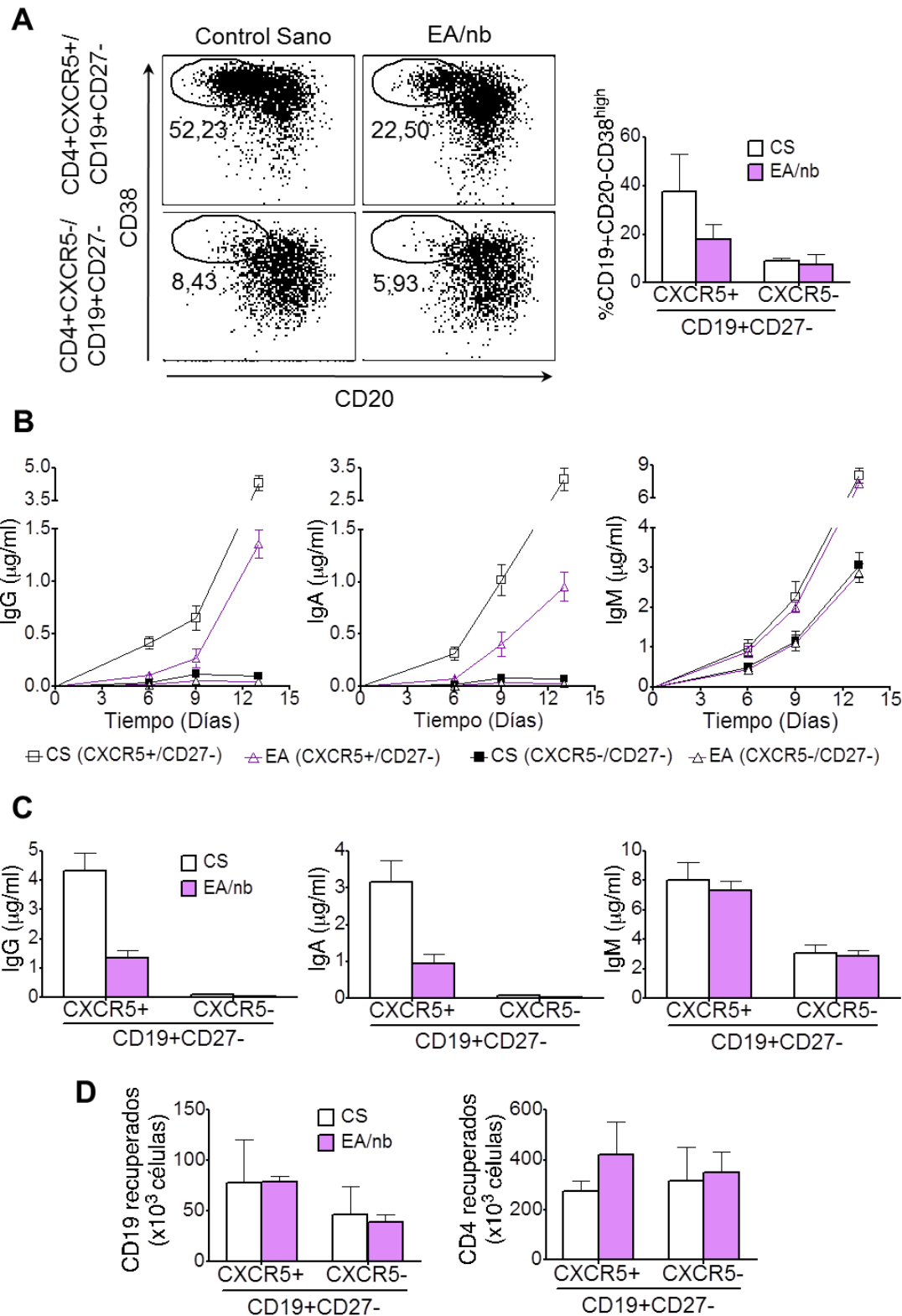
Una vez que habíamos comprobado que los pacientes con EA/nb presentaban proporciones disminuidas de células cTfh, junto con una disminución de las proporciones de las subpoblaciones de cTfh que mostraban un fenotipo asociado con la capacidad de ayudar a las células B, decidimos examinar la capacidad funcional de las células T CD4+CXCR5+ totales circulantes que contenían dichas proporciones disminuidas en estos pacientes. Con este fin establecimos cocultivos de células T CD4+CXCR5+ con células B vírgenes CD19+CD27- autólogas de 3 pacientes con EA/nb y 3 controles sanos pareados para edad y sexo, y medimos la secreción de IgG e IgA en los sobrenadantes de los cocultivos como lectura de la maduración de las células B. Los datos clínicos de los tres pacientes que participaron en el estudio funcional se muestran en la [Tabla 7](#).

	EA/nb		
	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
<b>Edad (años)</b>	45	51	57
<b>Sexo</b>	♂	♂	♂
<b>Tratamiento</b>	AINEs	AINEs	AINEs
<b>HLA-B27</b>	+	+	-
<b>Duración de los síntomas (años)</b>	28	33	36
<b>Tiempo desde el diagnóstico (años)</b>	25	27	13
<b>ASDAS-PCR</b>	3,40	2,75	2,05

**Tabla 7. Características clínicas de los pacientes con EA/nb que participaron en el estudio funcional de células T CD4+CXCR5+ circulantes.** EA/nb: pacientes con EA sin tratamiento con bloqueantes del TNF, HLA-B27: del inglés *human leukocyte antigen B27*, ASDAS-PCR: del inglés *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-PCR*.

En los cocultivos de las células B vírgenes con las células T CD4+CXCR5+ se observaron proporciones aumentadas de plasmablastos CD19+CD20-CD38<sup>high</sup> (**Figura 26A**). Además, detectamos IgG e IgA en los sobrenadantes de los cocultivos a partir del sexto día, con un incremento de las concentraciones hasta el décimo tercer día de cocultivo (**Figura 26B-C**). Destacar que en los cocultivos establecidos con células T y B de los pacientes con EA/nb se observaron menores proporciones de plasmablastos CD19+CD20-CD38<sup>high</sup> y menores concentraciones tanto de IgG como de IgA en comparación con los controles sanos (**Figura 26A-C**). Por el contrario, la cantidad de IgM secretada no fue diferente en los cocultivos de células B vírgenes con células T CD4+CXCR5+ procedentes de controles sanos o de pacientes con EA/nb (**Figura 26B-C**). Con estos resultados estábamos demostrando que dichos pacientes se caracterizaban por presentar una disminución en el cambio de isotipo de las Igs que venía determinado por poseer una disminución de células cTfh que tienen capacidad para ayudar a las células B en su diferenciación y maduración. Destacar también, que el número de células B viables recuperadas no fue diferente entre los cocultivos establecidos en controles sanos y en pacientes con EA/nb (**Figura 26D**), por lo tanto la menor producción de Igs encontrada en estos pacientes no fue debida a una menor viabilidad de las células B totales, sino que era consecuencia de una disminución en las proporciones de las células cTfh junto con una disminución de las proporciones de las subpoblaciones de cTfh.

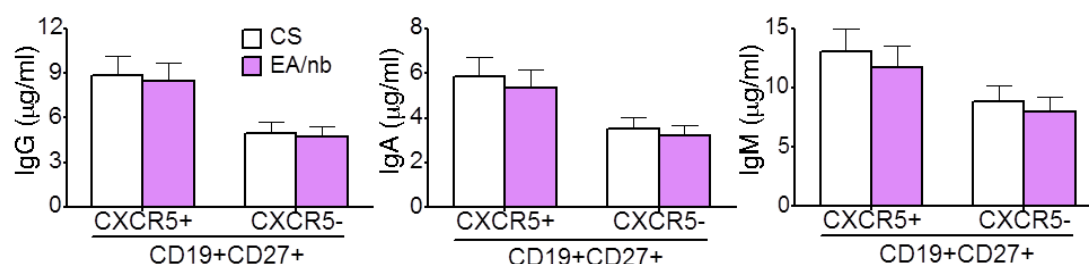
Por otro lado, no fuimos capaces de detectar IgG e IgA en los sobrenadantes de los cocultivos de células B vírgenes con células T CD4+CXCR5- en pacientes con EA/nb ni en controles sanos (**Figura 26B-C**), produciendo ambos tan sólo pequeñas cantidades de IgM (**Figura 26B-C**). Esto no se podía atribuir a una pobre supervivencia de las células T ya que la cantidad de células T viables recuperadas fue comparable en los cocultivos de las células B vírgenes establecidas tanto con células T CD4+CXCR5+ como con CD4+CXCR5- (**Figura 26D**). Por lo tanto, estábamos demostrando que las células T CD4+CXCR5- no tenían capacidad de ayudar a la maduración y función de los linfocitos B vírgenes.



**Figura 26. Capacidad funcional de las células T CD4+CXCR5+ circulantes.** (A) Plasmablastos CD19+CD20-CD38<sup>high</sup> a los 9 días del cocultivo de células T CD4+ CXCR5+ o CXCR5- con células B vírgenes autólogas en Controles Sanos (CS) o pacientes con EA/nb. (B, C) Concentraciones de IgG, IgA e IgM a diferentes tiempos (B) o a 13 días (C) en los cocultivos mencionados. (D) Células B y T viables recuperadas a los 9 días en los cocultivos mencionados. Los gráficos de barras representan la media y desviación estándar de 3 experimentos independientes.



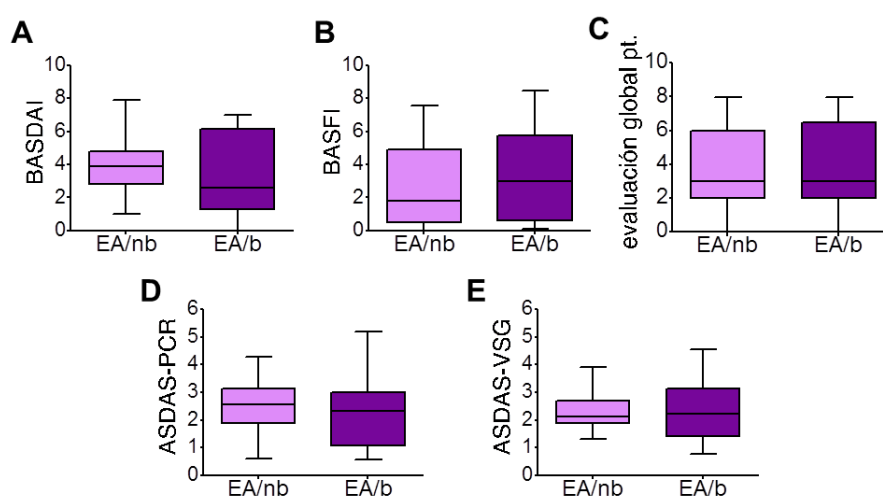
Del mismo modo, las células T CD4+CXCR5+ aisladas de controles sanos y pacientes con EA/nb también demostraron ser más eficientes que las células T CD4+CXCR5- a la hora de ayudar a las células B de memoria CD19+CD27+ a secretar IgG, IgA e IgM (**Figura 27**). Cuando medimos la secreción de Igs en los cocultivos de células CD4+CXCR5+/CD19+CD27+ o de células CD4+CXCR5-/CD19+CD27+, observamos que no existían diferencias entre los controles sanos y los pacientes con EA/nb (**Figura 27**).



**Figura 27. Capacidad funcional de las células T CD4+CXCR5+ cocultivadas con células B de memoria.** Concentraciones de IgG, IgA e IgM a 13 días en los cocultivos de células T CD4+CXCR5+ o CD4+CXCR5- con células B de memoria (CD19+CD27+) autólogas en pacientes con EA/nb o Controles Sanos (CS). Los gráficos de barras representan la media y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

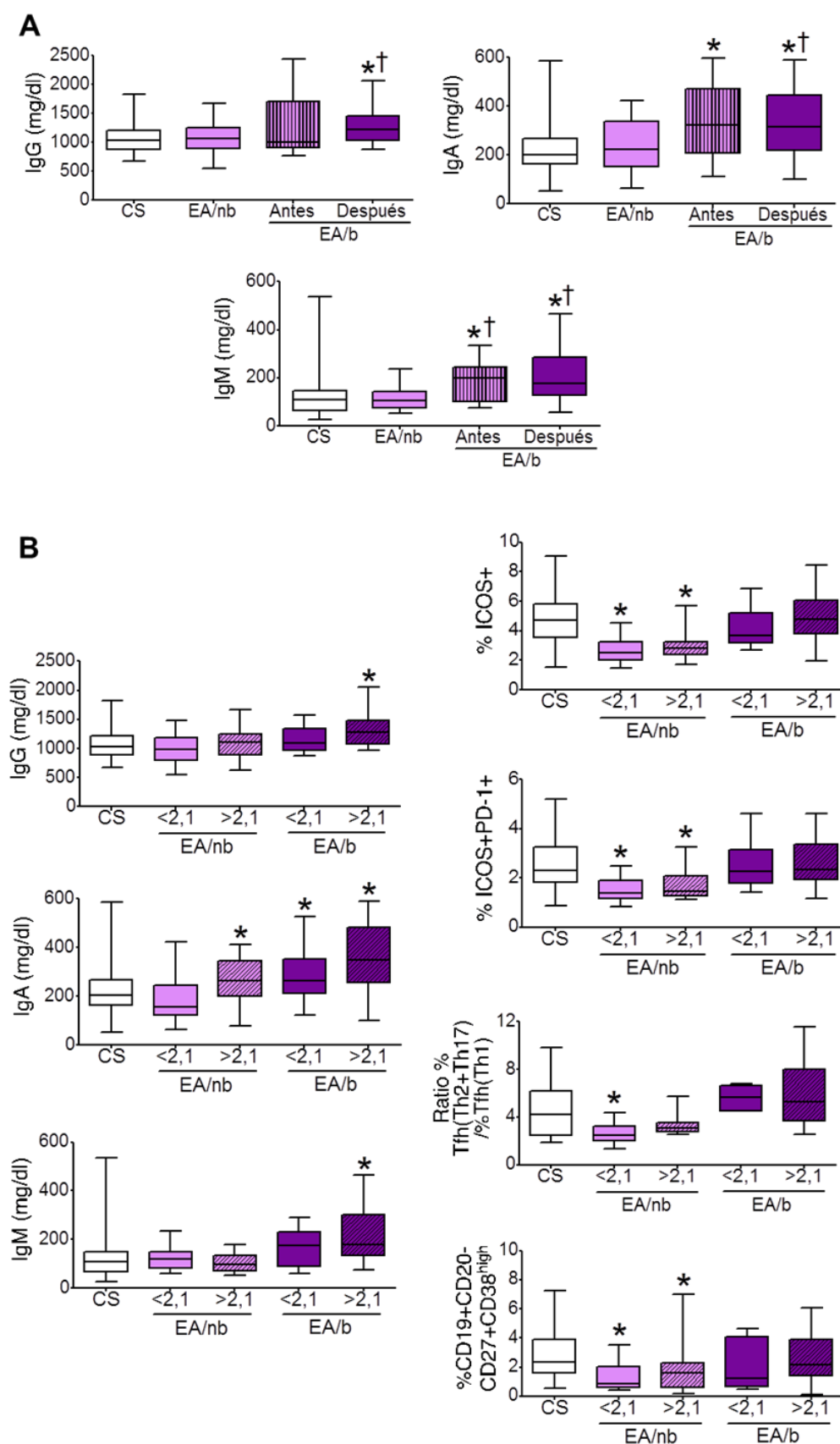
## 5. NIVELES DE IgG, IgA E IgM EN SUERO DE PACIENTES CON EA Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD Y EL NÚMERO DE cTfh

En primer lugar, pudimos observar que no existían diferencias en cuanto a los diferentes parámetros clínicos analizados entre los pacientes con EA/nb y EA/b (**Figura 28A-E**).



**Figura 28. Parámetros clínicos en pacientes con EA/nb y EA/b.** (A) Índice de BASDAI. (B) Índice de BASFI. (C) Evaluación global del paciente. (D) ASDAS-PCR. (E) ASDAS-VSG. Los gráficos de cajas de A-E representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos calculados a partir de 25 pacientes con EA/nb y 25 pacientes con EA/b.

A continuación, analizamos los niveles de Igs en el suero de nuestros pacientes con EA. Previamente, algunos autores habían descrito que los niveles de IgA se encontraban elevados en el suero de pacientes con esta enfermedad (Trull et al., 1984; Franssen et al., 1985), lo cual confirmamos en nuestros pacientes con EA (**Figura 29A-B**). Llama la atención que en el caso de los pacientes con EA/nb las cantidades de IgA en suero sólo se hallaban aumentadas en aquellos pacientes que tenían una actividad de la enfermedad elevada o muy elevada determinada por ASDAS-PCR  $>2,1$  (Machado et al., 2011) (**Figura 29B**). Por el contrario, todos nuestros pacientes con EA/b mostraban cantidades aumentadas de IgA en suero independientemente de la actividad, aunque los niveles eran más elevados en los pacientes con actividad de la enfermedad elevada o muy elevada (**Figura 29B**). Además, los pacientes con EA/b presentaban niveles aumentados de IgG e IgM, que fueron más marcados en los sujetos con niveles de actividad de la enfermedad elevados o muy elevados (**Figura 29B**). Cabe destacar que los niveles aumentados de IgA e IgM en este grupo de pacientes se hallaban ya presentes en los sueros justo antes de comenzar el tratamiento con bloqueantes del TNF (**Figura 29A**). Esto es consistente con estudios previos que indican que los pacientes con EA con actividad grave pueden mostrar aumentados los niveles de las tres Igs (IgG, IgA e IgM) (Richter et al., 1983). De manera llamativa, los niveles normales o aumentados de Igs descritos anteriormente no iban en paralelo con los números disminuidos o normales de cTfh y de plasmablastos observados en los pacientes con EA/nb o EA/b, respectivamente (**Figura 29B**). Es decir, los pacientes con EA/nb mostraban niveles normales o aumentados de IgA en presencia de proporciones disminuidas de cTfh, de plasmablastos, y de una ratio alterada de las subpoblaciones de cTfh (**Figura 29B**). Asimismo, los pacientes con EA/b mostraban un aumento de los niveles de Igs en presencia de valores de cTfh, de la ratio de las subpoblaciones de cTfh y de plasmablastos que no eran diferentes a los encontrados en controles sanos (**Figura 29B**). Por último, mientras que las concentraciones de Igs en suero iban en paralelo a la actividad de la enfermedad, los números de cTfh y de plasmablastos no lo hicieron (**Figura 29B**).



**Figura 29. Niveles de IgG, IgA e IgM en suero de pacientes con EA y relación con la actividad de la enfermedad.** (A) IgG, IgA e IgM fueron determinadas por nefelometría en los sueros de controles sanos (CS), pacientes con EA/nb y EA/b. En los pacientes con EA/b, la determinación de inmunoglobulinas (Igs) fue realizada en los sueros obtenidos el día que se realizó el estudio fenotípico y también en los sueros que

## Resultados

habían sido obtenidos justo antes del inicio del tratamiento con bloqueantes del TNF. **(B)** Relación de las concentraciones de Igs en suero con cTfh, plasmablastos circulantes y la actividad de la enfermedad. Se muestran las proporciones de cTfh, de la ratio de las subpoblaciones de cTfh y de los plasmablastos circulantes junto con las concentraciones de IgG, IgA e IgM en suero de CS, de pacientes EA con actividad de la enfermedad inactiva o moderada (ASDAS-PCR  $<2,1$ ) (Machado et al., 2011) y de pacientes EA con actividad de la enfermedad elevada o muy elevada (ASDAS-PCR  $>2,1$ ) (Machado et al., 2011). Los gráficos de cajas de **A** y **B** representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos a partir de 25 pacientes con EA/nb, 25 pacientes con EA/b y 50 CS. \* $p<0,05$  vs CS, † $p<0,05$  vs pacientes con EA/nb.





## V. DISCUSIÓN

---





El objetivo principal de esta Tesis ha sido estudiar la biología de varias subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup> en EspA. En primer lugar, nos centramos en el estudio de la biología de las células Th17 tanto en EspA0-nr como en EA. Finalmente, analizamos la biología de las células cTfh, con capacidad de ayudar a la diferenciación y función de los linfocitos B, en pacientes con EA establecida.

## **A. ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS Th17 EN PACIENTES CON ESPONDILOARTRITIS AXIAL NO RADIOLÓGICA DE RECIENTE COMIENZO Y ESPONDILITIS ANQUILOSANTE ESTABLECIDA**

La importancia de las células Th17 en la patogenia de las EspA se ha demostrado en una gran variedad de estudios de expresión en humanos (Jandus et al., 2008; Leipe et al., 2010; Romero-Sanchez et al., 2011; Shen et al., 2009a; Singh et al., 2007; Wang et al., 2009b), evidencias genéticas (Di Meglio et al., 2011; Sarin et al., 2011), modelos *in vitro* (Bowness et al., 2011) y modelos animales (Abe et al., 2009; Ebihara et al., 2015; Glatigny et al., 2012; Kezic et al., 2012), pero existe información limitada en pacientes con EspA0-nr. Al investigar la frecuencia de células Th17 circulantes en estos pacientes detectamos una disminución de dicha frecuencia con respecto a los controles sanos, pero sin existir diferencias entre pacientes HLA-B27<sup>+</sup> y HLA-B27<sup>-</sup>. Además, la frecuencia de células Th1 y Th17/Th1 circulantes, junto con la secreción de IL-17A e IFN $\gamma$  derivada de células T CD4<sup>+</sup> también se encontraban disminuidas en pacientes con EspA0-nr. Este hecho no se podía atribuir a un defecto generalizado de la producción de citoquinas puesto que la frecuencia de células T circulantes que expresaban TNF $\alpha$  o IL-10, junto con la secreción de TNF $\alpha$ , IL-10, IL-4 e IL-22 derivada de células T CD4<sup>+</sup> no fue diferente en pacientes con EspA0-nr comparados con controles sanos. Es decir, las células T CD4<sup>+</sup> de los pacientes mostraban una disminución selectiva de la frecuencia de células Th17 y Th1 y de la secreción de IL-17A e IFN $\gamma$ . Por el contrario, en nuestros pacientes con EA establecida observamos una expresión de IL-17A e IFN $\gamma$  que era similar a la observada en controles sanos, lo cual sugiere que las diferencias encontradas en los pacientes con EspA0-nr podrían estar relacionadas con los distintos estadios de la enfermedad y/o deberse a diferencias en la medicación de los pacientes. Existen estudios previos acerca de la frecuencia de células Th17 en sangre periférica de pacientes con EA, pero con resultados

contradictorios ya que algunos autores han descrito frecuencias de Th17 aumentadas (Bowness et al., 2011; Shen et al., 2009a; Zhang et al., 2012) y otras frecuencias similares a las observadas en controles sanos (Appel et al., 2011a). Estos últimos datos concuerdan con nuestros resultados en pacientes con EA. Las discordancias de nuestros resultados con otros estudios podrían deberse a diferencias en la medicación, duración de la enfermedad, actividad de la enfermedad y/o la metodología utilizada.

Actualmente, existe información escasa en relación a la biología de las células Th17 en pacientes con EspA0-nr, debido en parte a que la definición de criterios de clasificación apropiados es muy reciente (Rudwaleit et al., 2011). Hasta donde sabemos, sólo se ha publicado un artículo sobre Th17 en EspA axial de reciente comienzo que incluía pacientes con o sin cambios radiológicos por imagen y que encontró un aumento de la frecuencia de células T CD4+ IL-17+ en PBMCs de los pacientes (Jansen et al., 2014). La diferencia con respecto a nuestros resultados puede deberse a la selección de pacientes ya que incluyeron sujetos que estaban tratados tanto con FAMEs como con bloqueantes del TNF, además de incluir en el mismo grupo pacientes que también presentaban psoriasis, dactilitis y EII. Se sabe que estos tratamientos y la presencia de manifestaciones extra-axiales y/o extra-articulares pueden modificar la secreción de citoquinas (Baeten et al., 2001b; Limón-Camacho et al., 2012). Por otro lado, existían diferencias en cuanto a la duración de los síntomas de la enfermedad y la edad de los pacientes. En lo referente a los síntomas de la enfermedad, fue menor en el caso de nuestros pacientes sin superar en ningún momento 22 meses de duración. En cambio, en muchos de sus pacientes la duración de la enfermedad era superior a dos años y por lo cual no se considerarían de reciente comienzo. En cuanto a la edad, nuestros pacientes no rebasaban los 45 años de edad, no siendo así en el caso del estudio de Jansen y col. (Jansen et al., 2014). De esta forma, nuestros pacientes, pero no los suyos, cumplían los dos criterios iniciales determinados por el grupo ASAS para la inclusión de éstos en el grupo de EspA axiales.

El hallazgo de una disminución de células Th17 en pacientes con EspA0-nr que nunca han recibido tratamiento con FAMEs, esteroides o biológicos es muy llamativo, y no es fácil de explicar desde una perspectiva patomecánica. Se ha descrito la presencia de células Th17 en las articulaciones facetarias de pacientes con EA (Appel et al., 2011a), y es posible que en etapas iniciales de la enfermedad la recirculación de las células Th17 a través de la sangre periférica sea limitada debido al secuestro en los lugares inflamatorios. Además, en articulaciones facetarias de EA también se ha observado la presencia de

neutrófilos con tinción positiva para IL-17 (Appel et al., 2011a) y en tejido sinovial de EspA los mastocitos parecen ser la mayor fuente de IL-17 (Noordenbos et al., 2012), lo cual sugiere que estos tipos celulares podrían presentar un papel importante en la patogenia de las EspA (Yeremenko and Baeten, 2011). También se ha descrito que otras posibles fuentes de IL-17, como células T  $\gamma/\delta$  y células NK podrían ser patogénicas (Cua and Tato, 2010; Ito et al., 2009). En este contexto, no pudimos detectar ninguna expresión de IL-17 en células T CD8+,  $\gamma/\delta$  o NK de sangre periférica de controles sanos, de pacientes con EA o EspA0-nr, resultados que son consistentes con los publicados por otros autores (Shen et al., 2009a; Jansen et al., 2014).

De manera inesperada, nuestros pacientes con EspA0-nr no solamente mostraban una disminución de células Th17 sino también sus células Th1 circulantes se encontraban disminuidas en comparación con controles sanos, sin existir diferencias entre HLA-B27+ y HLA-B27-, mientras que el porcentaje de células Th1 en sangre periférica de nuestros pacientes con EA fue similar a la observada en controles sanos. Trabajos previos en EA han descrito tanto disminución (Baeten et al., 2001b; Ergin et al., 2011; Rudwaleit et al., 2001) como frecuencias normales (Shen et al., 2009a) de células Th1. Por otro lado, el trabajo ya mencionado de Jansen y col. en EspA de reciente comienzo mostró que los porcentajes de células Th1 circulantes no eran diferentes a los observados en controles sanos (Jansen et al., 2014). De nuevo, nuestros resultados estarían indicando que los pacientes en etapas iniciales de la enfermedad se caracterizarían por un estado inmunológico diferente.

Del mismo modo, la frecuencia de células Th17/Th1 caracterizadas por coexpresar IL-17A e IFN $\gamma$ , estaba disminuida en pacientes con EspA0-nr HLA-B27+ y HLA-B27-. Estos datos podrían estar en relación con la disminución de células Th17 puesto que varios estudios indican que las células doble positivas proceden de células Th17 que adquieren características Th1 (Annunziato et al., 2013; Cosmi et al., 2014).

En paralelo, estudiamos la frecuencia de células Treg ya que se ha descrito que podrían estar implicadas en la patogenia de enfermedades autoinmunes e inflamatorias y sus números se han encontrado alterados en sangre periférica de pacientes con LES y AR (Chavele and Ehrenstein, 2011). Al analizar esta población de células T CD4+ pudimos observar que la frecuencia de células T CD4+CD25+CD127- y células T CD4+FoxP3+ en pacientes con EspA0-nr no fue diferente a la encontrada en controles sanos. Hasta donde

conocemos, este es el primer estudio de la frecuencia de este tipo celular en pacientes con EspA0-nr, aunque previamente, un trabajo de Appel y col. (Appel et al., 2011b) indicaba que la frecuencia de células T CD4+FoxP3+ en sangre periférica de EspA establecidas, en el que se incluían 8 sujetos con EspA indiferenciada, no era diferente a la detectada en controles sanos, lo que concuerda con nuestros resultados.

El hallazgo más llamativo de nuestro estudio fue la excelente correlación negativa entre los diferentes parámetros clínicos de la enfermedad (BASDAI, BASFI, ASDAS-PCR, ASDAS-VSG, ASQOL y evaluación global del paciente) y las frecuencias de células Th17, Th1 y Th17/Th1 en sangre periférica de pacientes con EspA0-nr HLA-B27+. Estas asociaciones con los datos clínicos son especialmente llamativas teniendo en cuenta la dificultad en la evaluación de la actividad clínica en EspA debido a la ausencia de un patrón oro universalmente aceptado (Machado et al., 2011), y teniendo en cuenta que algunos de los índices utilizados miden solamente un aspecto de la enfermedad o están sesgados por la valoración del paciente o del médico. De manera sorprendente, en los pacientes con EspA0-nr HLA-B27- no hallamos ninguna correlación entre los parámetros clínicos y las frecuencias de dichas células. Por el contrario, en pacientes con EA la correlación entre el índice BASDAI y las células Th17 circulantes no era negativa sino positiva, aunque estas células no estaban aumentadas con respecto a los controles sanos. Es decir, los pacientes con EA que mostraban mayores índices de actividad de la enfermedad tendían a presentar niveles más elevados de células Th17 circulantes. Este hecho era contrario a lo que sucedía en EspA0-nr, donde los niveles de actividad de la enfermedad más elevados se asociaban con valores más bajos de células Th17 circulantes. Estas observaciones refuerzan la teoría de que la biología de las células Th17 sería diferente en EspA0-nr en comparación con EA. Además, previamente Baeten y col (Baeten et al., 2001b) habían descrito una correlación negativa entre la evaluación global del paciente y las células Th1 circulantes en pacientes con EspA establecida de larga duración, lo que confirmaría que los valores de algunos subtipos de células T *helper* en sangre periférica podrían utilizarse como marcadores alternativos de la actividad de la enfermedad.

Una posible explicación para la disminución de células Th17 y Th1 encontrada en nuestros pacientes con EspA0-nr estaría en relación con los datos obtenidos en un estudio sobre polimorfismos de un solo nucleótido (SNP del inglés *Single-Nucleotide Polymorphisms*) en genes asociados con la vía de señalización de la IL-23 (Coffre et al., 2013). En este estudio, los autores demostraron que pacientes con EspA presentaban varios

SNPs llamados “protectores” en los *loci* de *IL23R* e *IL12B*, que se asociaban a una disminución de los niveles de genes y citoquinas relacionados tanto con células Th17 como con Th1. Puesto que estos pacientes con genotipos “protectores” desarrollaban de todos modos la enfermedad, concluyeron que otros factores genéticos como por ejemplo los polimorfismos de *ERAP1* o *ANTXR2* podrían modular negativamente la patobiología de la enfermedad. Teniendo en cuenta estos datos, tenemos como objetivo futuro estudiar dichos SNPs en nuestros pacientes con EspA0-nr.

## **B. ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS Tfh EN PACIENTES CON ESPONDILITIS ANQUILOSANTE ESTABLECIDA**

Las EspA y su prototipo de enfermedad EA, no se asocian generalmente con autoanticuerpos circulantes (Ambarus et al., 2012; Rudwaleit et al., 2009b, 2011) y este puede ser el motivo por el que el papel de las células B o de las células Tfh no se ha investigado minuciosamente en la patogenia de estas enfermedades. Sin embargo, existen evidencias recientes que indican que las células B podrían estar implicadas en las EspA (Cantaert et al., 2012; Song et al., 2010) y varios autores han detectado autoanticuerpos en estas enfermedades (Baerlecken et al., 2014; Baraliakos et al., 2014; Wright et al., 2012). Por este motivo nos planteamos estudiar en pacientes con EA establecida las frecuencias de células T circulantes que poseen capacidad de ayudar a la diferenciación y maduración de los linfocitos B, llamadas células cTfh. Al mismo tiempo quisimos estudiar la frecuencia de plasmablastos circulantes en dichos pacientes.

En primer lugar, hemos descrito que pacientes con EA/nb mostraban una disminución de la frecuencia de células cTfh, junto con una disminución de la frecuencia de plasmablastos circulantes. Además, observamos una proporción alterada de las subpoblaciones de cTfh en estos pacientes, encontrando un predominio de células Tfh-Th1, subpoblación sin capacidad ayudadora de los linfocitos B (Morita et al., 2011), sobre células Tfh-Th17 y Tfh-Th2, subpoblaciones con esta capacidad (Morita et al., 2011). Por el contrario, estas alteraciones no se encontraron en pacientes EA/b. Las discordancias de nuestros resultados con observaciones publicadas previamente en EA pueden atribuirse a diferencias en el tratamiento, origen étnico, duración y/o actividad de la enfermedad de los pacientes (Wu et al., 2015; Xiao et al., 2013).

Debido a que los pacientes con EA/nb no estaban tomando metotrexato ni otros fármacos que pueden interferir con el ciclo celular, las alteraciones observadas en cTfh y plasmablastos no son atribuibles a un efecto farmacológico. En cambio, las frecuencias normales de cTfh y plasmablastos en pacientes con EA en tratamiento con bloqueantes del TNF (EA/b) sugiere que estos medicamentos podrían equilibrar la alteración inmune inicial. Asimismo, teniendo en cuenta que los índices de ASDAS-PCR y ASDAS-VSG son similares entre los pacientes con EA/nb y EA/b, las diferencias encontradas en el número de cTfh y el balance de las subpoblaciones de cTfh no parecen estar relacionadas con

diferencias en la actividad de la enfermedad. Además, no se observó correlación de células cTfh con la actividad de la enfermedad en ninguno de los dos grupos de pacientes. Del mismo modo, se ha publicado que en pacientes con LES (Simpson et al., 2010) y AR (Arroyo-Villa et al., 2014) el incremento del número de cTfh no se asociaba con la actividad, pero sí con la patogenia de estas enfermedades.

Destacar que los estudios funcionales *ex vivo* que hemos descrito confirman que las células T CD4+CXCR5+ aisladas de sangre periférica son capaces de proporcionar ayuda a las células B como previamente se había descrito por otros autores (Chevalier et al., 2011; Morita et al., 2011; Vinuesa and Cook, 2011), ya que a diferencia de las CD4+CXCR5-, inducían la secreción de IgG e IgA en los cocultivos con células B vírgenes CD19+CD27-. En cambio, en presencia de células T CD4+CXCR5-, las células B CD19+CD27- sólo producían pequeñas cantidades de IgM como era de esperar (Chevalier et al., 2011; Morita et al., 2011). Además, las células B de memoria CD19+CD27+ producían mayor cantidad de Igs en presencia de CXCR5+ en comparación con CXCR5-. En relación con lo anterior, cuando realizamos el estudio funcional en pacientes con EA/nb, observamos que sus células T CD4+CXCR5+ totales, que contenían proporciones disminuidas de cTfh y un balance alterado de las subpoblaciones de cTfh, presentaban una reducida capacidad ayudadora de las células B vírgenes, como se indicaba por una menor secreción inducida de IgG e IgA en comparación con los controles sanos. Por el contrario, la cantidad de IgM producida en los cocultivos de células T CD4+CXCR5+ con células B vírgenes autólogas de pacientes con EA/nb o controles sanos, era similar. Hasta donde conocemos, este es el primer estudio que evalúa el efecto de las células Tfh sobre la maduración de los linfocitos B en pacientes con una enfermedad reumática.

Nuestros resultados en pacientes con EA/nb contrastan con las frecuencias elevadas de cTfh y plasmablastos descritas en enfermedades autoinmunes caracterizadas por la producción de autoanticuerpos (Arroyo-Villa et al., 2014; Feng et al., 2011; Luo et al., 2013; Simpson et al., 2010; Szabo et al., 2013; Wang et al., 2013; Zhu et al., 2012). De hecho, se ha propuesto que el aumento del número de cTfh puede ser un marcador en enfermedades autoinmunes (Vinuesa and Cook, 2011). Concretamente, en ratones se ha demostrado una relación causal entre la acumulación de células Tfh, producción de autoanticuerpos y nefropatía lúpica (Linterman et al., 2009), y en pacientes con LES se ha demostrado que el aumento del número de los homólogos de Tfh en sangre periférica se asociaba con la severidad de la enfermedad (Choi et al., 2015). Por el contrario, en

pacientes con déficit en CD40L o ICOS se generaban CGs hipocelulares con escasas Tfh clásicas lo cual se acompañaba de una disminución de células T CD4+CXCR5+ circulantes, sugiriendo que el número de cTfh sería un reflejo del número de células Tfh típicas de los órganos linfoides (Bossaller et al., 2006). Por lo tanto, la disminución de cTfh encontrada en nuestros pacientes con EA/nb podría ser un reflejo de la disminución de células Tfh clásicas localizadas en los órganos linfoides de estos pacientes.

Por otro lado, la disminución de la frecuencia de cTfh y plasmablastos circulantes encontradas en EA/nb podría deberse a una contribución predominante de la inmunidad innata frente a inmunidad adquirida en la patogenia de la enfermedad (Ambarus et al., 2012) o bien estar relacionada con una menor capacidad de estos pacientes para producir anticuerpos dependientes de células T. Sin embargo, la EA no se ha asociado con inmunodeficiencia, y los pacientes con EA/nb son capaces de generar una buena respuesta de anticuerpos frente a la vacunación con antígenos dependientes de células T (Salinas et al., 2013).

Alternativamente, las células Tfh podrían estar secuestradas en el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal o GALT (del inglés *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) en los pacientes con EA/nb. De hecho, en más del 65% de los pacientes con EA se ha descrito una inflamación subclínica del intestino (Mielants et al., 1995) que se asocia con un aumento del número de folículos linfoides en íleon y colon (Demetter et al., 2002). Además, se ha observado un aumento de la permeabilidad intestinal no solo en pacientes con EA sino también en sus familiares sanos de primer grado (Martínez-González et al., 1994). En este contexto, los números normales de células cTfh y de plasmablastos en nuestros pacientes con EA/b, de los cuales la mayoría estaban recibiendo tratamiento con IFX o ADA, podrían reflejar una mejoría de la inflamación intestinal subclínica inducida por estos fármacos. Esto sería concordante con estudios que indican que el TNF $\alpha$  tendría un papel importante en la homeostasis intestinal, en la integridad de la barrera del intestino y en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal (Gibson, 2004). Sin embargo, los niveles de IgG, IgA e IgM en el suero de pacientes con EA/nb o EA/b son discordantes con los números de cTfh, la ratio de las subpoblaciones de cTfh o los plasmablastos circulantes: pacientes con EA/nb que presentan una disminución de cTfh y plasmablastos mostraban concentraciones normales o elevadas de IgA en suero, mientras que pacientes con EA/b caracterizados por presentar números normales de cTfh y plasmablastos mostraban concentraciones de Igs aumentadas. Además, mientras que los números de cTfh



o plasmablastos no se relacionaban con los parámetros de actividad de la enfermedad en pacientes con EA/nb o EA/b, los niveles en suero de IgA en EA/nb o de IgG, IgA e IgM en EA/b sí lo hacían, lo cual es consistente con observaciones previas (Casals Sánchez et al., 1992; Franssen et al., 1985; Trull et al., 1984).

En relación con los niveles de Igs en el suero de los pacientes, destacar que los pacientes con EA/b mostraban concentraciones de IgA e IgM aumentadas antes del comienzo del tratamiento con bloqueantes del TNF, y éstas no regresaban a niveles normales con el tratamiento, ni siquiera en pacientes que lograban un estado de inactividad o actividad moderada determinada por ASDAS-PCR. Esto sugiere que los pacientes con EA/b presentan una enfermedad más grave en comparación con los pacientes EA/nb, y que el aumento de las concentraciones de Igs en este grupo no es un efecto del tratamiento con bloqueantes del TNF. Además, estas observaciones reflejan la dificultad a la hora de valorar la actividad y la gravedad de la enfermedad en EA con las herramientas disponibles actualmente (Machado et al., 2011).

La falta de paralelismo del número de cTfh y plasmablastos con los niveles de Igs séricas podría explicarse por dos mecanismos diferentes. El primero de ellos sería que las células Tfh y plasmablastos podrían estar secuestrados en el GALT, como ya se ha mencionado anteriormente. La ratio alterada de las subpoblaciones de cTfh de los pacientes con EA/nb podría ser el resultado de un acúmulo preferencial de células Tfh-Th17 sobre Tfh-Th1 en el intestino ya que CCL20, el ligando para CCR6, se expresa a niveles normales en el GALT y en el epitelio intestinal, y su nivel de expresión aumenta significativamente en estados de inflamación del intestino, lo que podría condicionar la acumulación local de células que expresan CCR6 (Izadpanah et al., 2001; Wang et al., 2009a). Este secuestro local podría permitir la disminución del número de cTfh y de plasmablastos circulantes, junto con una ratio alterada de las subpoblaciones de cTfh, en los pacientes con EA/nb. De esta forma, los pacientes con EA/b, con una enfermedad más grave y una alteración de la permeabilidad intestinal más marcada, tendrían una mayor acumulación de Tfh y plasmablastos en el GALT, lo cual condicionaría una elevada producción local de Igs y un aumento del número de linfocitos disponibles para recirculación, dando lugar no solo a niveles elevados de Igs séricas (Zimmermann et al., 2012), sino también a números aparentemente normales de Tfh y plasmablastos circulantes.

Este secuestro de Tfh en los lugares inflamados no parece ocurrir en enfermedades autoinmunes como LES, pues el aumento de los números de Tfh clásicas totales en los órganos linfoides se asocia con un aumento del número de cTfh y de la producción de autoanticuerpos (Simpson et al., 2010). Así pues, el secuestro local de Tfh en el intestino sería un mecanismo que funcionaría de manera diferencial en pacientes con EA.

Una explicación alternativa para nuestros resultados sería que el número de cTfh fuese realmente un reflejo del verdadero número de Tfh típicas en los órganos linfoides de los pacientes con EA. Es decir, números disminuidos de cTfh en EA/nb o números normales de cTfh en pacientes con EA/b serían indicativos de la presencia de un *pool* disminuido o normal de células Tfh clásicas, respectivamente. En este escenario podría estar implicado uno de los mecanismos operantes en la inmunidad innata: la recombinación con cambio de isotipo o *class switch recombination* independiente de células T, la cual podría contribuir de manera importante a la producción de Igs tanto en pacientes EA/nb como EA/b (Bergqvist et al., 2010; Macpherson et al., 2000). A su vez, las cifras normales de cTfh en EA/b reflejarían la activación del sistema inmune adaptativo en pacientes con una enfermedad más grave (Iwasaki and Medzhitov, 2010; Van Praet et al., 2012). De hecho, se ha propuesto que el papel de la inmunidad innata es predominante en los estadios iniciales de la inflamación intestinal en EspA, y a medida que la enfermedad progresa o aumenta su gravedad, la contribución de la inmunidad adquirida tiende a predominar (Van Praet et al., 2012).

Finalmente, ambos mecanismos, el secuestro local de Tfh y el aumento de producción de Igs mediada por la inmunidad innata, podrían estar actuando de manera simultánea en la EA.





## **VI. CONCLUSIONES**

---



De todo lo expuesto en esta Tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

**A. ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS Th17 EN  
PACIENTES CON ESPONDILOARTRITIS AXIAL NO  
RADIOLÓGICA DE RECIENTE COMIENZO Y ESPONDILITIS  
ANQUILOSANTE ESTABLECIDA**

1. Las frecuencias de células Th17, Th1 y Th17/Th1 circulantes se encontraban disminuidas en pacientes con EspA0-nr independientemente de poseer o no la molécula HLA-B27. Estas frecuencias se correlacionaban negativamente con los parámetros clínicos sólo en pacientes con EspA0-nr HLA-B27+.
2. En pacientes con EA se observó una correlación positiva del índice BASDAI con las frecuencias de células Th17 circulantes a pesar de que los valores de las mismas no se encontraron aumentados.

**B. ESTUDIO SOBRE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS Tfh EN  
PACIENTES CON ESPONDILITIS ANQUILOSANTE  
ESTABLECIDA**

1. Los pacientes con EA/nb, pero no los EA/b, mostraron una disminución de células Tfh y plasmablastos circulantes junto con una alteración de la ratio de las subpoblaciones de cTfh, en presencia de niveles normales o aumentados de inmunoglobulinas.
2. Las células T CD4+CXCR5+, pero no las células CD4+CXCR5-, poseen la capacidad de ayudar e inducir la maduración de los linfocitos B vírgenes y de ayudar a los linfocitos B de memoria a producir inmunoglobulinas.
3. Las células T CD4+CXCR5+ de los pacientes con EA/nb, que contienen proporciones disminuidas de cTfh y un balance alterado de las subpoblaciones de cTfh, presentaron una capacidad reducida de promover la maduración de las células B vírgenes autólogas.





## ***Bibliografía***

---



- Abe, Y., Ohtsui, M., Ohtsui, N., Lin, Q., Tsurui, H., Nakae, S., Shirai, T., Sudo, K., and Hirose, S. (2009). Ankylosing enthesitis associated with up-regulated IFN-gamma and IL-17 production in (BXSB x NZB) F(1) male mice: a new mouse model. *Mod. Rheumatol. Jpn. Rheum. Assoc.* 19, 316–322.
- Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 8, 639–646.
- Akiba, H., Takeda, K., Kojima, Y., Usui, Y., Harada, N., Yamazaki, T., Ma, J., Tezuka, K., Yagita, H., and Okumura, K. (2005). The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 2340–2348.
- Allen, R.L., O’Callaghan, C.A., McMichael, A.J., and Bowness, P. (1999). Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 5045–5048.
- Ambarus, C., Yeremenko, N., Tak, P.P., and Baeten, D. (2012). Pathogenesis of spondyloarthritis: autoimmune or autoinflammatory? *Curr. Opin. Rheumatol.* 24, 351–358.
- van Amelsfort, J.M.R., van Roon, J.A.G., Noordegraaf, M., Jacobs, K.M.G., Bijlsma, J.W.J., Lafeber, F.P.J.G., and Taams, L.S. (2007). Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+,CD25+ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 56, 732–742.
- Amor, B., Dougados, M., and Mijiyawa, M. (1990). [Criteria of the classification of spondylarthropathies]. *Rev. Rhum. Mal. Ostéo-Articul.* 57, 85–89.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Filì, L., Ferri, S., Frosali, F., et al. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 204, 1849–1861.
- Annunziato, F., Santarlasci, V., Maggi, L., Cosmi, L., Liotta, F., and Romagnani, S. (2013). Reasons for rarity of Th17 cells in inflammatory sites of human disorders. *Semin. Immunol.* 25, 299–304.
- Antoniou, A.N., Ford, S., Taurog, J.D., Butcher, G.W., and Powis, S.J. (2004). Formation of HLA-B27 homodimers and their relationship to assembly kinetics. *J. Biol. Chem.* 279, 8895–8902.
- Appel, H., Maier, R., Wu, P., Scheer, R., Hempfing, A., Kayser, R., Thiel, A., Radbruch, A., Loddenkemper, C., and Sieper, J. (2011a). Analysis of IL-17(+) cells in facet joints of patients with spondyloarthritis suggests that the innate immune pathway might be of greater relevance than the Th17-mediated adaptive immune response. *Arthritis Res. Ther.* 13, R95.
- Appel, H., Wu, P., Scheer, R., Kedor, C., Sawitzki, B., Thiel, A., Radbruch, A., Sieper, J., and Syrbe, U. (2011b). Synovial and peripheral blood CD4+FoxP3+ T cells in spondyloarthritis. *J. Rheumatol.* 38, 2445–2451.

- Armuzzi, A., Lionetti, P., Blandizzi, C., Caporali, R., Chimenti, S., Cimino, L., Gionchetti, P., Girolomoni, G., Lapadula, G., Marchesoni, A., et al. (2014). anti-TNF agents as therapeutic choice in immune-mediated inflammatory diseases: focus on adalimumab. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 27, 11–32.
- Arroyo-Villa, I., Bautista-Caro, M.-B., Balsa, A., Aguado-Acín, P., Bonilla-Hernán, M.-G., Plasencia, C., Villalba, A., Nuño, L., Puig-Kröger, A., Martín-Mola, E., et al. (2014). Constitutively altered frequencies of circulating follicular helper T cell counterparts and their subsets in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 16, 500.
- Atagunduz, P., Appel, H., Kuon, W., Wu, P., Thiel, A., Kloetzel, P.-M., and Sieper, J. (2005). HLA-B27-restricted CD8<sup>+</sup> T cell response to cartilage-derived self peptides in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 52, 892–901.
- Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), Reveille, J.D., Sims, A.-M., Danoy, P., Evans, D.M., Leo, P., Pointon, J.J., Jin, R., Zhou, X., Bradbury, L.A., et al. (2010). Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat. Genet.* 42, 123–127.
- Baerlecken, N.T., Nothdorft, S., Stummvoll, G.H., Sieper, J., Rudwaleit, M., Reuter, S., Matthias, T., Schmidt, R.E., and Witte, T. (2014). Autoantibodies against CD74 in spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 1211–1214.
- Baeten, D., Kruithof, E., Van den Bosch, F., Demetter, P., Van Damme, N., Cuvelier, C., De Vos, M., Mielants, H., Veys, E.M., and De Keyser, F. (2001a). Immunomodulatory effects of anti-tumor necrosis factor alpha therapy on synovium in spondylarthropathy: histologic findings in eight patients from an open-label pilot study. *Arthritis Rheum.* 44, 186–195.
- Baeten, D., Van Damme, N., Van den Bosch, F., Kruithof, E., De Vos, M., Mielants, H., Veys, E.M., and De Keyser, F. (2001b). Impaired Th1 cytokine production in spondylarthropathy is restored by anti-TNFalpha. *Ann. Rheum. Dis.* 60, 750–755.
- Baeten, D., Baraliakos, X., Braun, J., Sieper, J., Emery, P., van der Heijde, D., McInnes, I., van Laar, J.M., Landewé, R., Wordsworth, P., et al. (2013). Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 382, 1705–1713.
- Baeten, D., Blanco, R., Geusens, P., Sieper, J., Jui-Cheng, T., Martin, R., Porter, B., and Richards, H. (2015a). Secukinumab Provides Sustained Improvements in the Signs and Symptoms of Active Ankylosing Spondylitis in Anti-TNF-Naïve Patients and Those Previously Exposed to Anti-TNF Therapy: 52-Week Results from Two Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 3 Trials.
- Baeten, D., Braun, J., Sieper, J., Dougados, M., Deodhar, A., Baraliakos, X., Porter, B., Gong, Y., and Richards, H. (2015b). Secukinumab Provides Sustained Improvements in the Signs and Symptoms of Active Ankylosing Spondylitis: 2-Year Efficacy and Safety Results from a Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial.

- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Brière, F., Galizzi, J.P., van Kooten, C., Liu, Y.J., Rousset, F., and Saeland, S. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 881–922.
- Baraliakos, X., Listing, J., Brandt, J., Zink, A., Alten, R., Burmester, G., Gromnica-Ihle, E., Kellner, H., Schneider, M., Sörensen, H., et al. (2005). Clinical response to discontinuation of anti-TNF therapy in patients with ankylosing spondylitis after 3 years of continuous treatment with infliximab. *Arthritis Res. Ther.* 7, R439–R444.
- Baraliakos, X., Baerlecken, N., Witte, T., Heldmann, F., and Braun, J. (2014). High prevalence of anti-CD74 antibodies specific for the HLA class II-associated invariant chain peptide (CLIP) in patients with axial spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 1079–1082.
- Benito-Miguel, M., García-Carmona, Y., Balsa, A., Pérez de Ayala, C., Cobo-Ibáñez, T., Martín-Mola, E., and Miranda-Carús, M.-E. (2009). A dual action of rheumatoid arthritis synovial fibroblast IL-15 expression on the equilibrium between CD4+CD25+ regulatory T cells and CD4+CD25- responder T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 8268–8279.
- Benjamin, R., and Parham, P. (1990). Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol. Today* 11, 137–142.
- Benjamin, R.J., Madrigal, J.A., and Parham, P. (1991). Peptide binding to empty HLA-B27 molecules of viable human cells. *Nature* 351, 74–77.
- Bergqvist, P., Stensson, A., Lycke, N.Y., and Bemark, M. (2010). T cell-independent IgA class switch recombination is restricted to the GALT and occurs prior to manifest germinal center formation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 3545–3553.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 749–795.
- Bosisio, D., Polentarutti, N., Sironi, M., Bernasconi, S., Miyake, K., Webb, G.R., Martin, M.U., Mantovani, A., and Muzio, M. (2002). Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* 99, 3427–3431.
- Bossaller, L., Burger, J., Draeger, R., Grimbacher, B., Knoth, R., Plebani, A., Durandy, A., Baumann, U., Schlesier, M., Welcher, A.A., et al. (2006). ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 4927–4932.
- Boswell, K.L., Paris, R., Boritz, E., Ambrozak, D., Yamamoto, T., Darko, S., Wloka, K., Wheatley, A., Narpala, S., McDermott, A., et al. (2014). Loss of circulating CD4 T cells with B cell helper function during chronic HIV infection. *PLoS Pathog.* 10, e1003853.

- Bowness, P., Ridley, A., Shaw, J., Chan, A.T., Wong-Baeza, I., Fleming, M., Cummings, F., McMichael, A., and Kollnberger, S. (2011). Th17 cells expressing KIR3DL2+ and responsive to HLA-B27 homodimers are increased in ankylosing spondylitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 2672–2680.
- Brandt, J., Haibel, H., Cornely, D., Golder, W., Gonzalez, J., Reddig, J., Thriene, W., Sieper, J., and Braun, J. (2000). Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab. *Arthritis Rheum.* 43, 1346–1352.
- Braun, J., and Sieper, J. (2002). Therapy of ankylosing spondylitis and other spondyloarthritides: established medical treatment, anti-TNF-alpha therapy and other novel approaches. *Arthritis Res.* 4, 307–321.
- Braun, J., Bollow, M., Remlinger, G., Eggens, U., Rudwaleit, M., Distler, A., and Sieper, J. (1998). Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum.* 41, 58–67.
- Braun, J., Brandt, J., Listing, J., Zink, A., Alten, R., Golder, W., Gromnica-Ihle, E., Kellner, H., Krause, A., Schneider, M., et al. (2002). Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet Lond. Engl.* 359, 1187–1193.
- Braun, J., Deodhar, A., Sieper, J., Dougados, M., Porter, B., Andersson, M., and Richards, H. (2015). Secukinumab Significantly Improves Signs and Symptoms of Active Ankylosing Spondylitis: 52-Week Results from a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 3 Trial with Subcutaneous Loading and Maintenance Dosing.
- Breban, M. (2006). Genetics of spondyloarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 20, 593–599.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Förster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.* 192, 1545–1552.
- Brown, D., Trowsdale, J., and Allen, R. (2004). The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens* 64, 215–225.
- Bush, K.A., Farmer, K.M., Walker, J.S., and Kirkham, B.W. (2002). Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum.* 46, 802–805.
- Cantaert, T., Doorenspleet, M.E., Francosalinas, G., Paramarta, J.E., Klarenbeek, P.L., Tiersma, Y., van der Loos, C.M., De Vries, N., Tak, P.P., and Baeten, D.L. (2012). Increased numbers of CD5+ B lymphocytes with a regulatory phenotype in spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 64, 1859–1868.
- Cargill, M., Schrodi, S.J., Chang, M., Garcia, V.E., Brandon, R., Callis, K.P., Matsunami, N., Ardlie, K.G., Civello, D., Catanese, J.J., et al. (2007). A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 273–290.

- Casals Sánchez, J.L., González Calvin, J., García Sánchez, A., Abellán Pérez, M., and Salvatierra Ríos, D. (1992). [Clinical activity and serum immunoglobulin concentrations in patients with ankylosing spondylitis]. *An. Med. Interna Madr. Spain* 1984 9, 214–216.
- Chang, H.-C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G.L., Jabeen, R., McKinley, C., Ahyi, A.-N., Han, L., et al. (2010). The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat. Immunol.* 11, 527–534.
- Chavele, K.-M., and Ehrenstein, M.R. (2011). Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.* 585, 3603–3610.
- Chen, Z., and O'Shea, J.J. (2008). Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol. Res.* 41, 87–102.
- Chevalier, N., Jarrossay, D., Ho, E., Avery, D.T., Ma, C.S., Yu, D., Sallusto, F., Tangye, S.G., and Mackay, C.R. (2011). CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 5556–5568.
- Choi, J.-Y., Ho, J.H., Pasoto, S.G., Bunin, V., Kim, S.T., Carrasco, S., Borba, E.F., Gonçalves, C.R., Costa, P.R., Kallas, E.G., et al. (2015). Circulating follicular helper-like T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 67, 988–999.
- Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 34, 932–946.
- Chou, C.-L., Wu, M.-J., Yu, C.-L., Lu, M.-C., Hsieh, S.-C., Wu, T.-H., Chou, C.-T., and Tsai, C.-Y. (2010). Anti-agalactosyl IgG antibody in ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Clin. Rheumatol.* 29, 875–881.
- Ciccia, F., Bombardieri, M., Principato, A., Giardina, A., Tripodo, C., Porcasi, R., Peralta, S., Franco, V., Giardina, E., Craxi, A., et al. (2009). Overexpression of interleukin-23, but not interleukin-17, as an immunologic signature of subclinical intestinal inflammation in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 60, 955–965.
- Coffre, M., Roumier, M., Rybczynska, M., Sechet, E., Law, H.K.W., Gossec, L., Dougados, M., Bianchi, E., and Rogge, L. (2013). Combinatorial control of Th17 and Th1 cell functions by genetic variations in genes associated with the interleukin-23 signaling pathway in spondyloarthritis. *Arthritis Rheum.* 65, 1510–1521.
- Colonna, M., Nakajima, H., Navarro, F., and López-Botet, M. (1999). A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 66, 375–381.
- Cosmi, L., De Palma, R., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Rodolico, G., Querci, V., Abbate, G., Angeli, R., et al. (2008). Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J. Exp. Med.* 205, 1903–1916.

- Cosmi, L., Maggi, L., Santarlaschi, V., Capone, M., Cardilicchia, E., Frosali, F., Querci, V., Angeli, R., Matucci, A., Fambrini, M., et al. (2010). Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 222–230.e1–e4.
- Cosmi, L., Maggi, L., Santarlaschi, V., Liotta, F., and Annunziato, F. (2014). T helper cells plasticity in inflammation. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 85, 36–42.
- Costantino, C.M., Baecher-Allan, C., and Hafler, D.A. (2008). Multiple sclerosis and regulatory T cells. *J. Clin. Immunol.* 28, 697–706.
- Craft, J.E. (2012). Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 337–347.
- Cua, D.J., and Tato, C.M. (2010). Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 479–489.
- Cubas, R.A., Mudd, J.C., Savoye, A.-L., Perreau, M., van Grevenynghe, J., Metcalf, T., Connick, E., Meditz, A., Freeman, G.J., Abesada-Terk, G., et al. (2013). Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat. Med.* 19, 494–499.
- Dambacher, J., Beigel, F., Zitzmann, K., De Toni, E.N., Göke, B., Diepolder, H.M., Auernhammer, C.J., and Brand, S. (2009). The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 58, 1207–1217.
- Danoy, P., Pryce, K., Hadler, J., Bradbury, L.A., Farrar, C., Pointon, J., Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium, Ward, M., Weisman, M., Reveille, J.D., et al. (2010). Association of variants at 1q32 and STAT3 with ankylosing spondylitis suggests genetic overlap with Crohn's disease. *PLoS Genet.* 6, e1001195.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.-C., et al. (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat. Immunol.* 9, 1347–1355.
- DeLay, M.L., Turner, M.J., Klenk, E.I., Smith, J.A., Sowders, D.P., and Colbert, R.A. (2009). HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis Rheum.* 60, 2633–2643.
- Demetter, P., Van Huysse, J.A., De Keyser, F., Van Damme, N., Verbruggen, G., Mielants, H., De Vos, M., Veys, E.M., and Cuvelier, C.A. (2002). Increase in lymphoid follicles and leukocyte adhesion molecules emphasizes a role for the gut in spondyloarthropathy pathogenesis. *J. Pathol.* 198, 517–522.
- Di Meglio, P., Di Cesare, A., Laggner, U., Chu, C.-C., Napolitano, L., Villanova, F., Tosi, I., Capon, F., Trembath, R.C., Peris, K., et al. (2011). The IL23R R381Q gene variant protects against immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans. *PloS One* 6, e17160.



- Dougados, M., and Baeten, D. (2011). Spondyloarthritis. *Lancet Lond. Engl.* 377, 2127–2137.
- Dougados, M., van der Linden, S., Juhlin, R., Huitfeldt, B., Amor, B., Calin, A., Cats, A., Dijkmans, B., Olivieri, I., and Pasero, G. (1991). The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* 34, 1218–1227.
- Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., et al. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461–1463.
- Duftner, C., Dejaco, C., Klauser, A., Falkenbach, A., Lakomek, H.J., and Schirmer, M. (2006). High positive predictive value of specific antibodies cross-reacting with a 28-kDa *Drosophila* antigen for diagnosis of ankylosing spondylitis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 45, 38–42.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 10, 857–863.
- Ebihara, S., Date, F., Dong, Y., and Ono, M. (2015). Interleukin-17 is a critical target for the treatment of ankylosing enthesitis and psoriasis-like dermatitis in mice. *Autoimmunity* 48, 259–266.
- Ergin, A., Syrbe, U., Scheer, R., Thiel, A., Adam, T., Büssow, K., Duchmann, R., Zeitz, M., and Sieper, J. (2011). Impaired peripheral Th1 CD4<sup>+</sup> T cell response to *Escherichia coli* proteins in patients with Crohn's disease and ankylosing spondylitis. *J. Clin. Immunol.* 31, 998–1009.
- Evans, D.M., Spencer, C.C.A., Pointon, J.J., Su, Z., Harvey, D., Kochan, G., Oppermann, U., Opperman, U., Dilthey, A., Pirinen, M., et al. (2011). Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat. Genet.* 43, 761–767.
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., et al. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J. Clin. Invest.* 119, 3573–3585.
- Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* 30, 324–335.
- Feng, J., Lu, L., Hua, C., Qin, L., Zhao, P., Wang, J., Wang, Y., Li, W., Shi, X., and Jiang, Y. (2011). High frequency of CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> TFH cells in patients with immune-active chronic hepatitis B. *PloS One* 6, e21698.
- Finzel, S., Kraus, S., Schmidt, S., Hueber, A., Rech, J., Engelke, K., Englbrecht, M., and Schett, G. (2013). Bone anabolic changes progress in psoriatic arthritis patients despite treatment with methotrexate or tumour necrosis factor inhibitors. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1176–1181.

- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330–336.
- Förster, R., Emrich, T., Kremmer, E., and Lipp, M. (1994). Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood* 84, 830–840.
- Fossiez, F., Banchereau, J., Murray, R., Van Kooten, C., Garrone, P., and Lebecque, S. (1998). Interleukin-17. *Int. Rev. Immunol.* 16, 541–551.
- Franssen, M.J., van de Putte, L.B., and Gribnau, F.W. (1985). IgA serum levels and disease activity in ankylosing spondylitis: a prospective study. *Ann. Rheum. Dis.* 44, 766–771.
- Gaffen, S.L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 556–567.
- Georgopoulos, K., Dick, W.C., Goodacre, J.A., and Pain, R.H. (1985). A reinvestigation of the cross-reactivity between Klebsiella and HLA-B27 in the aetiology of ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Immunol.* 62, 662–671.
- Gibson, P.R. (2004). Increased gut permeability in Crohn's disease: is TNF the link? *Gut* 53, 1724–1725.
- Glatigny, S., Fert, I., Blaton, M.A., Lories, R.J., Araujo, L.M., Chiocchia, G., and Breban, M. (2012). Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum.* 64, 110–120.
- Gottlieb, A.B. (2007). Tumor necrosis factor blockade: mechanism of action. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res.* 12, 1–4.
- Haroon, N., Tsui, F.W., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., and Inman, R.D. (2012). Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) exhibits functionally significant interaction with HLA-B27 and relates to subtype specificity in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 589–595.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6, 1123–1132.
- He, J., Tsai, L.M., Leong, Y.A., Hu, X., Ma, C.S., Chevalier, N., Sun, X., Vandenberg, K., Rockman, S., Ding, Y., et al. (2013). Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity* 39, 770–781.

- van der Heijde, D., Kavanaugh, A., Gladman, D.D., Antoni, C., Krueger, G.G., Guzzo, C., Zhou, B., Dooley, L.T., de Vlam, K., Geusens, P., et al. (2007). Infliximab inhibits progression of radiographic damage in patients with active psoriatic arthritis through one year of treatment: Results from the induction and maintenance psoriatic arthritis clinical trial 2. *Arthritis Rheum.* 56, 2698–2707.
- van der Heijde, D., Landewé, R., Baraliakos, X., Houben, H., van Tubergen, A., Williamson, P., Xu, W., Baker, D., Goldstein, N., Braun, J., et al. (2008a). Radiographic findings following two years of infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 58, 3063–3070.
- van der Heijde, D., Landewé, R., Einstein, S., Ory, P., Vosse, D., Ni, L., Lin, S.-L., Tsuji, W., and Davis, J.C. (2008b). Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept. *Arthritis Rheum.* 58, 1324–1331.
- van der Heijde, D., Salonen, D., Weissman, B.N., Landewé, R., Maksymowych, W.P., Kupper, H., Ballal, S., Gibson, E., Wong, R., Canadian (M03-606) study group, et al. (2009). Assessment of radiographic progression in the spines of patients with ankylosing spondylitis treated with adalimumab for up to 2 years. *Arthritis Res. Ther.* 11, R127.
- van der Heijde, D., Sieper, J., Maksymowych, W.P., Dougados, M., Burgos-Vargas, R., Landewé, R., Rudwaleit, M., Braun, J., and Assessment of SpondyloArthritis international Society (2011). 2010 Update of the international ASAS recommendations for the use of anti-TNF agents in patients with axial spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 905–908.
- Helmick, C.G., Felson, D.T., Lawrence, R.C., Gabriel, S., Hirsch, R., Kwoh, C.K., Liang, M.H., Kremers, H.M., Mayes, M.D., Merkel, P.A., et al. (2008). Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum.* 58, 15–25.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.
- Hymowitz, S.G., Filvaroff, E.H., Yin, J.P., Lee, J., Cai, L., Risser, P., Maruoka, M., Mao, W., Foster, J., Kelley, R.F., et al. (2001). IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J.* 20, 5332–5341.
- Ito, Y., Usui, T., Kobayashi, S., Iguchi-Hashimoto, M., Ito, H., Yoshitomi, H., Nakamura, T., Shimizu, M., Kawabata, D., Yukawa, N., et al. (2009). Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 2294–2303.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327, 291–295.
- Izadpanah, A., Dwinell, M.B., Eckmann, L., Varki, N.M., and Kagnoff, M.F. (2001). Regulated MIP-3 $\alpha$ /CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280, G710–G719.

- Jaeckel, E., Mpofu, N., Saal, N., and Manns, M.P. (2008). Role of regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* 40, 126–136.
- Jandus, C., Bioley, G., Rivals, J.-P., Dudler, J., Speiser, D., and Romero, P. (2008). Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides. *Arthritis Rheum.* 58, 2307–2317.
- Jansen, D.T.S.L., Hameetman, M., van Bergen, J., Huizinga, T.W.J., van der Heijde, D., Toes, R.E.M., and van Gaalen, F.A. (2014). IL-17-producing CD4+ T cells are increased in early, active axial spondyloarthritis including patients without imaging abnormalities. *Rheumatology*.
- Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 325, 1006–1010.
- Jovanovic, D.V., Di Battista, J.A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F.C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F., and Pelletier, J.P. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 160, 3513–3521.
- Kanaseki, T., Blanchard, N., Hammer, G.E., Gonzalez, F., and Shastri, N. (2006). ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity* 25, 795–806.
- Kezic, J.M., Glant, T.T., Rosenbaum, J.T., and Rosenzweig, H.L. (2012). Neutralization of IL-17 ameliorates uveitis but damages photoreceptors in a murine model of spondyloarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 14, R18.
- Khan, M.A. (2002). Update on spondyloarthropathies. *Ann. Intern. Med.* 136, 896–907.
- Khan, M.A., Mathieu, A., Sorrentino, R., and Akkoc, N. (2007). The pathogenetic role of HLA-B27 and its subtypes. *Autoimmun. Rev.* 6, 183–189.
- Khare, S.D., Luthra, H.S., and David, C.S. (1995). Spontaneous inflammatory arthritis in HLA-B27 transgenic mice lacking beta 2-microglobulin: a model of human spondyloarthropathies. *J. Exp. Med.* 182, 1153–1158.
- Khare, S.D., Hansen, J., Luthra, H.S., and David, C.S. (1996). HLA-B27 heavy chains contribute to spontaneous inflammatory disease in B27/human beta2-microglobulin (beta2m) double transgenic mice with disrupted mouse beta2m. *J. Clin. Invest.* 98, 2746–2755.
- Kim, C.H., Rott, L.S., Clark-Lewis, I., Campbell, D.J., Wu, L., and Butcher, E.C. (2001). Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J. Exp. Med.* 193, 1373–1381.
- King, C., Tangye, S.G., and Mackay, C.R. (2008). T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 741–766.

- Kirman, I., Whelan, R.L., and Nielsen, O.H. (2004). Infliximab: mechanism of action beyond TNF- $\alpha$  neutralization in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 639–641.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485–517.
- Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* 40, 280–293.
- Lanier, L.L. (1998). Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I. *Cell* 92, 705–707.
- Layh-Schmitt, G., and Colbert, R.A. (2008). The interleukin-23/interleukin-17 axis in spondyloarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 20, 392–397.
- Le Coz, C., Joublin, A., Pasquali, J.-L., Korganow, A.-S., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2013). Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease. *PloS One* 8, e75319.
- Leipe, J., Grunke, M., Dechant, C., Reindl, C., Kerzendorf, U., Schulze-Koops, H., and Skapenko, A. (2010). Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* 62, 2876–2885.
- Li, H., Nourbakhsh, B., Cullimore, M., Zhang, G.-X., and Rostami, A. (2011). IL-9 is important for T-cell activation and differentiation in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Eur. J. Immunol.* 41, 2197–2206.
- Li, X., Wu, Z., Ding, J., Zheng, Z., Li, X., Chen, L., and Zhu, P. (2012). Role of the frequency of blood CD4(+) CXCR5(+) CCR6(+) T cells in autoimmunity in patients with Sjögren's syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422, 238–244.
- Limón-Camacho, L., Vargas-Rojas, M.I., Vázquez-Mellado, J., Casasola-Vargas, J., Moctezuma, J.F., Burgos-Vargas, R., and Llorente, L. (2012). In vivo peripheral blood proinflammatory T cells in patients with ankylosing spondylitis. *J. Rheumatol.* 39, 830–835.
- van der Linden, S., Valkenburg, H.A., and Cats, A. (1984). Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* 27, 361–368.
- Linterman, M.A., Rigby, R.J., Wong, R.K., Yu, D., Brink, R., Cannons, J.L., Schwartzberg, P.L., Cook, M.C., Walters, G.D., and Vinuesa, C.G. (2009). Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* 206, 561–576.
- Locci, M., Havenar-Daughton, C., Landais, E., Wu, J., Kroenke, M.A., Arlehamn, C.L., Su, L.F., Cubas, R., Davis, M.M., Sette, A., et al. (2013). Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* 39, 758–769.
- Lubberts, E. (2010). Th17 cytokines and arthritis. *Semin. Immunopathol.* 32, 43–53.

- Lubberts, E., Koenders, M.I., Oppers-Walgreen, B., van den Bersselaar, L., Coenen-de Roo, C.J.J., Joosten, L.A.B., and van den Berg, W.B. (2004). Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum.* 50, 650–659.
- Luo, C., Li, Y., Liu, W., Feng, H., Wang, H., Huang, X., Qiu, L., and Ouyang, J. (2013). Expansion of circulating counterparts of follicular helper T cells in patients with myasthenia gravis. *J. Neuroimmunol.* 256, 55–61.
- Machado, P., Landewé, R., Lie, E., Kvien, T.K., Braun, J., Baker, D., van der Heijde, D., and Assessment of SpondyloArthritis international Society (2011). Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS): defining cut-off values for disease activity states and improvement scores. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 47–53.
- Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000). A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288, 2222–2226.
- Martínez-González, O., Cantero-Hinojosa, J., Paule-Sastre, P., Gómez-Magán, J.C., and Salvatierra-Ríos, D. (1994). Intestinal permeability in patients with ankylosing spondylitis and their healthy relatives. *Br. J. Rheumatol.* 33, 644–647.
- May, E., Dorris, M.L., Satumtira, N., Iqbal, I., Rehman, M.I., Lightfoot, E., and Taurog, J.D. (2003). CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 1099–1105.
- Mewar, D., and Wilson, A.G. (2011). Treatment of rheumatoid arthritis with tumour necrosis factor inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* 162, 785–791.
- Mielants, H., Veys, E.M., Cuvelier, C., De Vos, M., Goemaere, S., De Clercq, L., Schatteman, L., and Elewaut, D. (1995). The evolution of spondyloarthropathies in relation to gut histology. II. Histological aspects. *J. Rheumatol.* 22, 2273–2278.
- Miossec, P., Korn, T., and Kuchroo, V.K. (2009). Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. Engl. J. Med.* 361, 888–898.
- Moll, J.M., Haslock, I., Macrae, I.F., and Wright, V. (1974). Associations between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropathies, and Behcet's syndrome. *Medicine (Baltimore)* 53, 343–364.
- Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., et al. (2011). Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34, 108–121.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 136, 2348–2357.

- Möttönen, M., Heikkinen, J., Mustonen, L., Isomäki, P., Luukkainen, R., and Lassila, O. (2005). CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* *140*, 360–367.
- Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2003). Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 6173–6177.
- Nistala, K., Adams, S., Cambrook, H., Ursu, S., Olivito, B., de Jager, W., Evans, J.G., Cimaz, R., Bajaj-Elliott, M., and Wedderburn, L.R. (2010). Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 14751–14756.
- Noack, M., and Miossec, P. (2014). Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun. Rev.* *13*, 668–677.
- Nogralles, K.E., Zaba, L.C., Shemer, A., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Kikuchi, T., Ramon, M., Bergman, R., Krueger, J.G., and Guttman-Yassky, E. (2009). IL-22-producing “T22” T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* *123*, 1244–1252.e2.
- Noordenbos, T., Yeremenko, N., Gofita, I., van de Sande, M., Tak, P.P., Cañete, J.D., and Baeten, D. (2012). Interleukin-17-positive mast cells contribute to synovial inflammation in spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* *64*, 99–109.
- Nurieva, R., Yang, X.O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A.D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S.S., Jetten, A.M., et al. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* *448*, 480–483.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.-H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* *325*, 1001–1005.
- O’Shea, J.J., Holland, S.M., and Staudt, L.M. (2013). JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N. Engl. J. Med.* *368*, 161–170.
- Osta, B., Benedetti, G., and Miossec, P. (2014). Classical and Paradoxical Effects of TNF- $\alpha$  on Bone Homeostasis. *Front. Immunol.* *5*, 48.
- Oukka, M. (2008). Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Ann. Rheum. Dis.* *67 Suppl 3*, iii26–iii29.
- Ouyang, H., Shi, Y., Liu, Z., Feng, S., Li, L., Su, N., Lu, Y., and Kong, S. (2013). Increased interleukin-9 and CD4<sup>+</sup>IL-9<sup>+</sup> T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Mol. Med. Rep.* *7*, 1031–1037.
- Pahl, H.L., and Baeuerle, P.A. (1997). The ER-overload response: activation of NF-kappa B. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 63–67.

- Paramarta, J.E., and Baeten, D. (2014). Spondyloarthritis: from unifying concepts to improved treatment. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 53, 1547–1559.
- Paramarta, J.E., De Rycke, L., Heijda, T.F., Ambarus, C.A., Vos, K., Dinant, H.J., Tak, P.P., and Baeten, D.L. (2013a). Efficacy and safety of adalimumab for the treatment of peripheral arthritis in spondyloarthritis patients without ankylosing spondylitis or psoriatic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1793–1799.
- Paramarta, J.E., Heijda, T.F., and Baeten, D.L. (2013b). Fast relapse upon discontinuation of tumour necrosis factor blocking therapy in patients with peripheral spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1581–1582.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., et al. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6, 1133–1141.
- Peh, C.A., Burrows, S.R., Barnden, M., Khanna, R., Cresswell, P., Moss, D.J., and McCluskey, J. (1998). HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading. *Immunity* 8, 531–542.
- Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L., Lunardi, C., Annunziato, F., Romagnani, S., et al. (2010). Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 115, 335–343.
- Poddubnyy, D., and Rudwaleit, M. (2012). Early spondyloarthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 38, 387–403.
- Pointon, J.J., Harvey, D., Karaderi, T., Appleton, L.H., Farrar, C., Stone, M.A., Sturrock, R.D., Brown, M.A., and Wordsworth, B.P. (2010). Elucidating the chromosome 9 association with AS; CARD9 is a candidate gene. *Genes Immun.* 11, 490–496.
- Ramos, M., Alvarez, I., Sesma, L., Logean, A., Rognan, D., and López de Castro, J.A. (2002). Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 37573–37581.
- Raphael, I., and Forsthuber, T.G. (2012). Stability of T-cell lineages in autoimmune diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 8, 299–301.
- Rasheed, A.-U., Rahn, H.-P., Sallusto, F., Lipp, M., and Müller, G. (2006). Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur. J. Immunol.* 36, 1892–1903.
- Raza, A. (2000). Anti-TNF therapies in rheumatoid arthritis, Crohn's disease, sepsis, and myelodysplastic syndromes. *Microsc. Res. Tech.* 50, 229–235.
- Richter, M.B., Woo, P., Panayi, G.S., Trull, A., Unger, A., and Shepherd, P. (1983). The effects of intravenous pulse methylprednisolone on immunological and inflammatory processes in ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Immunol.* 53, 51–59.
- Robinson, D.S. (2009). Regulatory T cells and asthma. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 39, 1314–1323.



- Romero-Sanchez, C., Jaimes, D.A., Londoño, J., De Avila, J., Castellanos, J.E., Bello, J.M., Bautista, W., and Valle-Oñate, R. (2011). Association between Th-17 cytokine profile and clinical features in patients with spondyloarthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 29, 828–834.
- Romme Christensen, J., Börnsen, L., Ratzer, R., Piehl, F., Khademi, M., Olsson, T., Sørensen, P.S., and Sellebjerg, F. (2013). Systemic inflammation in progressive multiple sclerosis involves follicular T-helper, Th17- and activated B-cells and correlates with progression. *PloS One* 8, e57820.
- Rouvier, E., Luciani, M.F., Mattéi, M.G., Denizot, F., and Golstein, P. (1993). CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 150, 5445–5456.
- Rudwaleit, M., Siebert, S., Yin, Z., Eick, J., Thiel, A., Radbruch, A., Sieper, J., and Braun, J. (2001). Low T cell production of TNFalpha and IFNgamma in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism. *Ann. Rheum. Dis.* 60, 36–42.
- Rudwaleit, M., van der Heijde, D., Khan, M.A., Braun, J., and Sieper, J. (2004). How to diagnose axial spondyloarthritis early. *Ann. Rheum. Dis.* 63, 535–543.
- Rudwaleit, M., Landewé, R., van der Heijde, D., Listing, J., Brandt, J., Braun, J., Burgos-Vargas, R., Collantes-Estevez, E., Davis, J., Dijkmans, B., et al. (2009a). The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 770–776.
- Rudwaleit, M., van der Heijde, D., Landewé, R., Listing, J., Akkoc, N., Brandt, J., Braun, J., Chou, C.T., Collantes-Estevez, E., Dougados, M., et al. (2009b). The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 777–783.
- Rudwaleit, M., Haibel, H., Baraliakos, X., Listing, J., Märker-Hermann, E., Zeidler, H., Braun, J., and Sieper, J. (2009c). The early disease stage in axial spondylarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort. *Arthritis Rheum.* 60, 717–727.
- Rudwaleit, M., van der Heijde, D., Landewé, R., Akkoc, N., Brandt, J., Chou, C.T., Dougados, M., Huang, F., Gu, J., Kirazli, Y., et al. (2011). The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 25–31.
- Sahly, H., Podschun, R., Kekow, J., Nölle, B., Gross, W.L., and Ullmann, U. (1998). Humoral immune response to Klebsiella capsular polysaccharides in HLA-B27-positive patients with acute anterior uveitis and ankylosing spondylitis. *Autoimmunity* 28, 209–215.

- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *155*, 1151–1164.
- Salinas, G.F., De Rycke, L., Barendregt, B., Paramarta, J.E., Hreggvidsdottir, H., Cantaert, T., van der Burg, M., Tak, P.P., and Baeten, D. (2013). Anti-TNF treatment blocks the induction of T cell-dependent humoral responses. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 1037–1043.
- Sarin, R., Wu, X., and Abraham, C. (2011). Inflammatory disease protective R381Q IL23 receptor polymorphism results in decreased primary CD4+ and CD8+ human T-cell functional responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 9560–9565.
- Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A.B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J. Exp. Med.* *192*, 1553–1562.
- Schett, G., and David, J.-P. (2010). The multiple faces of autoimmune-mediated bone loss. *Nat. Rev. Endocrinol.* *6*, 698–706.
- Schmitt, E., Germann, T., Goedert, S., Hoehn, P., Huels, C., Koelsch, S., Kühn, R., Müller, W., Palm, N., and Rüde, E. (1994). IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *153*, 3989–3996.
- Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., and Ueno, H. (2014). Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol.* *35*, 436–442.
- Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* *569*, 29–63.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 163–189.
- Seregin, S.S., Rastall, D.P.W., Evnouchidou, I., Aylsworth, C.F., Quiroga, D., Kamal, R.P., Godbehere-Roosa, S., Blum, C.F., York, I.A., Stratikos, E., et al. (2013). Endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 alleles associated with increased risk of ankylosing spondylitis reduce HLA-B27 mediated presentation of multiple antigens. *Autoimmunity* *46*, 497–508.
- Sheehan, N.J. (2004). The ramifications of HLA-B27. *J. R. Soc. Med.* *97*, 10–14.
- Shen, H., Goodall, J.C., and Hill Gaston, J.S. (2009a). Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *60*, 1647–1656.
- Shen, H., Goodall, J.C., and Hill Gaston, J.S. (2009b). Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *60*, 1647–1656.

- Sherlock, J.P., Joyce-Shaikh, B., Turner, S.P., Chao, C.-C., Sathe, M., Grein, J., Gorman, D.M., Bowman, E.P., McClanahan, T.K., Yearley, J.H., et al. (2012). IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR- $\gamma$ t+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nat. Med.* 18, 1069–1076.
- Sieper, J., van der Heijde, D., Dougados, M., Mease, P.J., Maksymowych, W.P., Brown, M.A., Arora, V., and Pangan, A.L. (2013). Efficacy and safety of adalimumab in patients with non-radiographic axial spondyloarthritis: results of a randomised placebo-controlled trial (ABILITY-1). *Ann. Rheum. Dis.* 72, 815–822.
- Simpson, N., Gatenby, P.A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., Manku, H., Vyse, T.J., Roncador, G., Huttley, G.A., et al. (2010). Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 62, 234–244.
- Singh, R., Aggarwal, A., and Misra, R. (2007). Th1/Th17 cytokine profiles in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthritis. *J. Rheumatol.* 34, 2285–2290.
- Skurkovich, S., and Skurkovich, B. (2005). Anticytokine therapy, especially anti-interferon-gamma, as a pathogenetic treatment in TH-1 autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1051, 684–700.
- Song, I.-H., Heldmann, F., Rudwaleit, M., Listing, J., Appel, H., Braun, J., and Sieper, J. (2010). Different response to rituximab in tumor necrosis factor blocker-naïve patients with active ankylosing spondylitis and in patients in whom tumor necrosis factor blockers have failed: a twenty-four-week clinical trial. *Arthritis Rheum.* 62, 1290–1297.
- Song, I.-H., Althoff, C.E., Haibel, H., Hermann, K.-G.A., Poddubnyy, D., Listing, J., Weiß, A., Djacenko, S., Burmester, G.R., Bohl-Bühler, M., et al. (2012). Frequency and duration of drug-free remission after 1 year of treatment with etanercept versus sulfasalazine in early axial spondyloarthritis: 2 year data of the ESTHER trial. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 1212–1215.
- Szabo, K., Papp, G., Barath, S., Gyimesi, E., Szanto, A., and Zeher, M. (2013). Follicular helper T cells may play an important role in the severity of primary Sjögren's syndrome. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 147, 95–104.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655–669.
- Taurog, J.D., Dorris, M.L., Satumtira, N., Tran, T.M., Sharma, R., Dressel, R., van den Brandt, J., and Reichardt, H.M. (2009). Spondylarthritis in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. *Arthritis Rheum.* 60, 1977–1984.
- Taylor, P.C. (2010). Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 308–315.

- Tiwana, H., Walmsley, R.S., Wilson, C., Yiannakou, J.Y., Ciclitira, P.J., Wakefield, A.J., and Ebringer, A. (1998). Characterization of the humoral immune response to *Klebsiella* species in inflammatory bowel disease and ankylosing spondylitis. *Br. J. Rheumatol.* 37, 525–531.
- Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E.H., Salfeld, J.G., and Tak, P.P. (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 117, 244–279.
- Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat. Immunol.* 10, 864–871.
- Trull, A., Ebringer, A., Panayi, G., Ebringer, R., and James, D.C. (1984). HLA-B27 and the immune response to enterobacterial antigens in ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Immunol.* 55, 74–80.
- Urban, R.G., Chicz, R.M., Lane, W.S., Strominger, J.L., Rehm, A., Kenter, M.J., UytdeHaag, F.G., Ploegh, H., Uchanska-Ziegler, B., and Ziegler, A. (1994). A subset of HLA-B27 molecules contains peptides much longer than nonamers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1534–1538.
- Utriainen, L., Firmin, D., Wright, P., Cerovic, V., Breban, M., McInnes, I., and Milling, S. (2012). Expression of HLA-B27 causes loss of migratory dendritic cells in a rat model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 64, 3199–3209.
- Van den Bosch, F., Kruithof, E., Baeten, D., De Keyser, F., Mielants, H., and Veys, E.M. (2000). Effects of a loading dose regimen of three infusions of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (infliximab) in spondyloarthropathy: an open pilot study. *Ann. Rheum. Dis.* 59, 428–433.
- Van Den Bosch, F., Kruithof, E., Baeten, D., Herssens, A., de Keyser, F., Mielants, H., and Veys, E.M. (2002). Randomized double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha (infliximab) versus placebo in active spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* 46, 755–765.
- Van Praet, L., Jacques, P., Van den Bosch, F., and Elewaut, D. (2012). The transition of acute to chronic bowel inflammation in spondyloarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 288–295.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* 9, 1341–1346.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532.
- Vinuesa, C.G., and Cook, M.C. (2011). Blood relatives of follicular helper T cells. *Immunity* 34, 10–12.

- Wang, C., Kang, S.G., Lee, J., Sun, Z., and Kim, C.H. (2009a). The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol.* 2, 173–183.
- Wang, J., Shan, Y., Jiang, Z., Feng, J., Li, C., Ma, L., and Jiang, Y. (2013). High frequencies of activated B cells and T follicular helper cells are correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 174, 212–220.
- Wang, M., Li, X., Chen, J., Zhou, Y., Cao, H., Wu, X., and Jiang, H. (2011). Screening and evaluating the mimic peptides as a useful serum biomarker of ankylosing spondylitis using a phage display technique. *Rheumatol. Int.* 31, 1009–1016.
- Wang, X., Lin, Z., Wei, Q., Jiang, Y., and Gu, J. (2009b). Expression of IL-23 and IL-17 and effect of IL-23 on IL-17 production in ankylosing spondylitis. *Rheumatol. Int.* 29, 1343–1347.
- Wellcome Trust Case Control Consortium, Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), Burton, P.R., Clayton, D.G., Cardon, L.R., Craddock, N., Deloukas, P., Duncanson, A., Kwiatkowski, D.P., McCarthy, M.I., et al. (2007). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat. Genet.* 39, 1329–1337.
- Wendling, D., Cedoz, J.-P., Racadot, E., and Dumoulin, G. (2007). Serum IL-17, BMP-7, and bone turnover markers in patients with ankylosing spondylitis. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 74, 304–305.
- Willrich, M.A.V., Murray, D.L., and Snyder, M.R. (2015). Tumor necrosis factor inhibitors: clinical utility in autoimmune diseases. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 165, 270–282.
- Wright, V. (1978). Seronegative polyarthritis: a unified concept. *Arthritis Rheum.* 21, 619–633.
- Wright, C., Sibani, S., Trudgian, D., Fischer, R., Kessler, B., LaBaer, J., and Bowness, P. (2012). Detection of multiple autoantibodies in patients with ankylosing spondylitis using nucleic acid programmable protein arrays. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 11, M9.00384.
- Wu, S., Yang, T., Pan, F., Xia, G., Hu, Y., Liu, L., Fan, D., Duan, Z., Ding, N., Xu, S., et al. (2015). Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with ankylosing spondylitis. *Mod. Rheumatol. Jpn. Rheum. Assoc.* 25, 110–115.
- Xiao, F., Zhang, H.-Y., Liu, Y.-J., Zhao, D., Shan, Y.-X., and Jiang, Y.-F. (2013). Higher frequency of peripheral blood interleukin 21 positive follicular helper T cells in patients with ankylosing spondylitis. *J. Rheumatol.* 40, 2029–2037.
- Xu, W., Li, R., Dai, Y., Wu, A., Wang, H., Cheng, C., Qiu, W., Lu, Z., Zhong, X., Shu, Y., et al. (2013). IL-22 secreting CD4<sup>+</sup> T cells in the patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 261, 87–91.

- Yao, Z., Fanslow, W.C., Seldin, M.F., Rousseau, A.M., Painter, S.L., Comeau, M.R., Cohen, J.I., and Spriggs, M.K. (1995a). Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 3, 811–821.
- Yao, Z., Painter, S.L., Fanslow, W.C., Ulrich, D., Macduff, B.M., Spriggs, M.K., and Armitage, R.J. (1995b). Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 5483–5486.
- Yeremenko, N., and Baeten, D. (2011). IL-17 in spondyloarthritis: is the T-party over? *Arthritis Res. Ther.* 13, 115.
- Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., et al. (2009). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* 31, 457–468.
- Zhang, L., Li, J.-M., Liu, X.-G., Ma, D.-X., Hu, N.-W., Li, Y.-G., Li, W., Hu, Y., Yu, S., Qu, X., et al. (2011). Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Immunol.* 31, 606–614.
- Zhang, L., Li, Y., Li, Y., Qi, L., Liu, X., Yuan, C., Hu, N., Ma, D., Li, Z., Yang, Q., et al. (2012). Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *PloS One* 7, e31000.
- Zhang, L., Fan, D., Liu, L., Yang, T., Ding, N., Hu, Y., Cai, G., Wang, L., Xin, L., Xia, Q., et al. (2015). Association Study of IL-12B Polymorphisms Susceptibility with Ankylosing Spondylitis in Mainland Han Population. *PloS One* 10, e0130982.
- Zhao, L., Jiang, Z., Jiang, Y., Ma, N., Zhang, Y., Feng, L., and Wang, K. (2013). IL-22+ CD4+ T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* 16, 518–526.
- Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587–596.
- Zheng, Y., Danilenko, D.M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., and Ouyang, W. (2007). Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 445, 648–651.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2010). Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol. Rev.* 238, 247–262.
- Zhu, C., Ma, J., Liu, Y., Tong, J., Tian, J., Chen, J., Tang, X., Xu, H., Lu, L., and Wang, S. (2012). Increased frequency of follicular helper T cells in patients with autoimmune thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 943–950.
- Zimmermann, K., Haas, A., and Oxenius, A. (2012). Systemic antibody responses to gut microbes in health and disease. *Gut Microbes* 3, 42–47.
- Zochling, J., van der Heijde, D., Burgos-Vargas, R., Collantes, E., Davis, J.C., Dijkmans, B., Dougados, M., Géher, P., Inman, R.D., Khan, M.A., et al. (2006). ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 442–452.

Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.-M., Smyth, M.J., et al. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* 207, 365–378.





***Anexo***

---



El trabajo incluido en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **Bautista-Caro MB**, Arroyo-Villa I, Castillo-Gallego C, de Miguel E, Peiteado D, Puig-Kröger A, Martín-Mola E, Miranda-Carús ME. Decreased Th17 and Th1 cells in the peripheral blood of patients with early non-radiographic axial spondyloarthritis: a marker of disease in HLA-B27+ patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Feb;52(2):352-62. **Obtención del premio SER-PFIZER de Espondiloartritis en 2013 por esta publicación.**
- **Bautista-Caro MB**, Arroyo-Villa I, Castillo-Gallego C, de Miguel E, Peiteado D, Plasencia-Rodriguez C, Villalba A, Sanchez-Mateos P, Puig-Kröger A, Martín-Mola E, Miranda-Carús ME. Decreased frequencies of circulating follicular helper T cell counterparts and plasmablasts in Ankylosing Spondylitis patients naïve for TNF blockers. *PLoS One* *PLoS One*. 2014 Sep 9;9(9):e107086.

Participación en otras publicaciones:

- Benito-Miguel M, García-Carmona Y, Balsa A, **Bautista-Caro MB**, Arroyo-Villa I, Cobo-Ibáñez T, Bonilla-Hernán MG, Pérez de Ayala C, Sánchez-Mateos P, Martín-Mola E, Miranda-Carús ME. IL-15 expression on RA synovial fibroblasts promotes B cell survival. *PLoS One*. 2012;7(7):e40620.
- Arroyo-Villa I, **Bautista-Caro MB**, Balsa A, Aguado-Acín P, Nuño L, Bonilla-Hernán MG, Puig-Kröger A, Martín-Mola E, Miranda-Carús ME. Frequency of Th 17 CD4+ T cells in early rheumatoid arthritis: a marker of anti-CCP seropositivity. *PLoS One*. 2012;7(8):e42189.
- Arroyo-Villa I, **Bautista-Caro MB**, Balsa A, Aguado-Acín P, Nuño L, Bonilla-Hernán MG, Plasencia C, Villalba A, Nuño L, Puig-Kröger A, Martín-Mola E, Miranda-Carús ME. Constitutively altered frequencies of circulating follicular helper T cell counterparts and their subsets in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014 Dec 5;16(6):500.

Las Espondiloartritis (EspA) son un grupo de enfermedades inflamatorias crónicas de etiología desconocida que comparten características clínicas, radiológicas y genéticas. El prototipo de enfermedad es la Espondilitis Anquilosante (EA) que junto a EspA axial no radiológica (EspA-nr) forman las EspA axiales que se caracterizan por un predominio de la afección de las articulaciones sacroilíacas y/o de la columna vertebral. Existen evidencias genéticas, modelos *in vitro*, estudios de expresión en humanos y modelos animales que apoyan la implicación del eje IL-23/IL-17 en la fisiopatología de las EspA, observando además una alteración de las células Th17 en esta enfermedad. Con estos antecedentes quisimos investigar la posible participación de estas células en pacientes con EA y EspA-nr de reciente comienzo (EspA0-nr) para poder dilucidar lo que sucede en estadios iniciales de la enfermedad. Al hacerlo, observamos que las frecuencias de células Th17, Th1 y Th17/Th1 circulantes junto con la secreción de IL-17A e IFN $\gamma$  se encontraban disminuidas en EspA0-nr independientemente de poseer o no la molécula HLA-B27, sin observar estas alteraciones en EA. Además, sólo en EspA0-nr HLA-B27+ existía una excelente correlación negativa de los parámetros clínicos BASDAI, BASFI, ASDAS-PCR, ASDAS-VSG, ASQOL y evaluación global del paciente con las frecuencias de células Th17, Th1 y Th17/Th1 de sangre periférica. Por el contrario, en EA se observó correlación positiva del índice BASDAI con las frecuencias de células Th17 circulantes.

Asimismo, aunque el papel de los linfocitos B y de la inmunidad humoral no está del todo claro en las EspA, algunos autores han detectado autoanticuerpos en estas enfermedades. Por este motivo, quisimos investigar en pacientes con EA la posible participación de las células Tfh (del inglés *T follicular helper*), cuya función es ayudar a la diferenciación y maduración de los linfocitos B a células plasmáticas. Al hacerlo, encontramos que los pacientes con EA que no habían recibido tratamiento con bloqueantes del TNF (EA/nb), pero no aquellos que sí lo estaban recibiendo (EA/b), mostraban una disminución de la frecuencia de células Tfh y de plasmablastos circulantes, junto con una proporción alterada de las subpoblaciones de cTfh, en presencia de niveles normales o aumentados de inmunoglobulinas. Por último, realizamos un estudio *ex vivo* donde demostramos que las células T CD4+CXCR5+ de los pacientes con EA/nb, que contenían proporciones disminuidas de cTfh y un balance alterado de las subpoblaciones de cTfh, presentaban una capacidad reducida de promover la maduración de las células B vírgenes autólogas.

En resumen, los resultados de esta Tesis han permitido profundizar en la posible implicación de las células Th17 y Tfh en la patogenia de las EspA.

